

Inhaltsverzeichnis

1.	Blutaufbereitung	1
1.1.	Geräte und Hilfsmittel.....	1
1.2.	Chemikalien.....	1
1.3.	Durchführung der Blutaufbereitung	1
1.3.1.	Hämatokrit-Bestimmung	1
1.3.2.	Gewinnung von Plasma.....	2
1.3.3.	Waschung der Erythrozyten	2
1.3.4.	Gewinnung von Serum	2
2.	Thiamin (Vitamin B1) – Transketolase (ETK) und α ETK in Erythrozyten.....	3
2.1.	Einführung	3
2.2.	Methode	3
2.3.	Geräte	4
2.4.	Chemikalien.....	4
2.5.	Durchführung.....	5
2.5.1.	Probenaufbereitung	5
2.5.2.	Probenansatz.....	5
2.6.	Auswertung	6
3.	Vitamin-C–Bestimmung im Blutplasma	7
3.1.	Allgemeines.....	7
3.2.	Prinzip der Methode	7
3.3.	Durchführung.....	10
3.4.	Berechnung/Auswertung	10
4.	Lipide und Lipoproteine	12
4.1.	Lipidstatus (LDL, HDL, TG) im Serum	12
4.1.1.	Charakteristik und Transport der Blutlipide	12
4.2.	Bestimmung des Gesamtcholesterols im Serum (CHOD-PAP-Methode)	13
4.2.1.	Methode und Reaktionsprinzip	13
4.2.2.	Durchführung	14
4.2.3.	Auswertung	14
4.3.	Bestimmung von HDL-Cholesterol im Serum (CHOD-PAP-Methode).....	14
4.3.1.	Methode.....	14
4.3.2.	Geräte und Hilfsmittel	14
4.3.3.	Chemikalien	14
4.3.4.	Durchführung	15
4.3.5.	Auswertung	15
4.4.	Triglycerid-Bestimmung im Serum (GPO-PAP-Methode).....	16
4.4.1.	Methode.....	16

4.4.2.	Durchführung	17
4.4.3.	Auswertung	17
4.5.	Berechnung des LDL-Cholesterols	17
4.6.	Auswertung	17
5.	Glukosekonzentration und L-Laktat-Konzentration im Blutplasma	18
5.1.	Glukosekonzentration	18
5.1.1.	Einführung	18
5.1.2.	Methode	18
5.1.3.	Durchführung	19
5.1.4.	Auswertung	20
5.2.	L-Laktat-Konzentration im Plasma	20
5.2.1.	Einführung	20
5.2.2.	Prinzip der Messung	20
5.2.3.	Durchführung	21
5.2.4.	Auswertung	22
6.	Harnanalyse	23
6.1.	Einführung	23
6.2.	Aufgabe	23
6.3.	Bericht und Zusammenfassung der Ergebnisse	23
6.4.	Vorbereitung auf den Versuch	24
6.5.	Sicherheit	24
6.6.	Hinweise	2
6.7.	24 h-Harn-Sammlung	2
6.7.1.	Verbrauchsmaterialien/Geräte	2
6.7.2.	Durchführung	2
6.7.3.	Auswertung	2
6.8.	Bestimmung des pH-Wertes	2
6.8.1.	Allgemeines	2
6.8.2.	Prinzip der Methode	2
6.8.3.	Durchführung	2
6.8.4.	Auswertung	2
6.9.	Qualitativer Nachweis von Eiweiß	2
6.9.1.	Allgemeines	2
6.9.2.	Prinzip der Methode	2
6.9.3.	Durchführung	2
6.9.4.	Auswertung	2
6.10.	Qualitativer Nachweis von Blut	2
6.10.1.	Allgemeines	2
6.10.2.	Prinzip der Methode	2

6.10.3.	Durchführung	3
6.10.4.	Auswertung	3
6.11.	Qualitativer Nachweis von Gesamtzucker	2
6.11.1.	Allgemeines	2
6.11.2.	Prinzip der Methode	2
6.11.3.	Durchführung	2
6.11.4.	Auswertung	2
6.12.	Qualitativer Nachweis von Pentosen	2
6.12.1.	Allgemeines	2
6.12.2.	Prinzip der Methode	2
6.12.3.	Durchführung	2
6.12.4.	Auswertung	3
6.13.	Qualitativer Nachweis von Fructose	3
6.13.1.	Allgemeines	3
6.13.2.	Prinzip der Methode	3
6.13.3.	Durchführung	2
6.13.4.	Auswertung	2
6.14.	Halbquantitativer Nachweis von Glucose	2
6.14.1.	Allgemeines	2
6.14.2.	Prinzip der Methode	2
6.14.3.	Durchführung	2
6.14.4.	Auswertung	2
6.15.	Quantitative Bestimmung von Glucose und Fructose	2
6.15.1.	Allgemeines	2
6.15.2.	Prinzip der Methode	2
6.15.3.	Durchführung	2
6.15.4.	Auswertung	2
6.16.	Aceton	2
6.16.1.	Allgemeines	2
6.16.2.	Prinzip der Methode	2
6.16.3.	Durchführung	2
6.16.4.	Auswertung	2
6.17.	Kreatinin	2
6.17.1.	Allgemeines	2
6.17.2.	Prinzip der Methode	2
6.17.3.	Durchführung	2
6.17.4.	Auswertung	3
6.18.	Quantitative Bestimmung von Harnsäure	4
6.18.1.	Allgemeines	4

6.18.2.	Prinzip der Methode.....	5
6.18.3.	Durchführung.....	5
6.18.4.	Auswertung.....	7
6.19.	Quantitative Bestimmung von Harnstoff.....	8
6.19.1.	Allgemeines	8
6.19.2.	Prinzip der Methode.....	8
6.19.3.	Durchführung.....	9
6.19.4.	Auswertung.....	11
7.	Skript zum Versuch Kalorimetrie.....	13
7.1.	Einführung	13
7.2.	Prinzip.....	13
7.3.	Bombenkalorimeter	13
7.4.	Kalorimetrie zur ‚Bestimmung des Brennwertes‘	14
7.4.1.	Geräte.....	14
7.4.2.	Versuch (Kurzbeschreibung)	14
7.4.3.	Durchführung und Berechnung	14
8.	Wassergehalt und Trockensubstanz	18
8.1.	Wassergehalt (Karl-Fischer-Titration)	18
8.1.1.	Prinzip der Methode.....	18
8.1.2.	Allgemeines Vorgehen:.....	18
8.1.3.	Arbeitsschritte	19
8.1.4.	Besonderheiten (volumetrische Methode).....	20
8.2.	Trockensubstanz	20
8.2.1.	Prinzip der Methode.....	20
8.2.2.	Durchführung.....	21
8.2.3.	Berechnung	21
8.3.	Asche	22
8.3.1.	Durchführung.....	22
8.3.2.	Berechnung	22
9.	Volumetrische Bestimmung des Invertzuckergehaltes im Honig	23
9.1.	Allgemeines.....	23
9.2.	Nachweismöglichkeit.....	23
9.3.	Gesetzliche Regelungen.....	24
9.4.	Prinzip der Methode.....	24
9.5.	Bestimmung reduzierender Zucker nach LUFF-SCHOORL.....	25
9.5.1.	Durchführung	25
9.6.	Auswertung.....	27
9.7.	Aufgabe	28
9.8.	Vorbereitung auf den Versuch.....	28

10.	Gesamtballaststoffe	33
10.1.	Prinzip der Methode	33
10.2.	Durchführung.....	33
10.3.	Berechnung	34
11.	Gesamtfett nach Soxhlet(Etherextrakt)	35
11.1.	Prinzip der Methode	35
11.2.	Durchführung.....	35
11.2.1.	HCl-Auflösung	35
11.2.2.	Extraktion.....	35
11.3.	Berechnung	36
11.4.	Wiederholbarkeit	36
11.5.	Vergleichbarkeit.....	36
11.6.	Andere Verfahren	36
11.7.	Schwerpunkte (Etherextraktbestimmung).....	37
12.	Enzymatische Bestimmung von Cholesterin in Lebensmitteln	38
12.1.	Prinzip der Methode	38
12.2.	Durchführung.....	38
12.3.	Berechnung	39
12.4.	Schwerpunkte.....	39
13.	Gesamt- und Reinprotein	40
13.1.	Gesamtprotein.....	40
13.1.1.	Prinzip der Methode.....	40
13.1.2.	Chemikalien	40
13.1.3.	Durchführung.....	40
13.1.4.	Berechnung	41
13.2.	Reinprotein (ZnSO ₄ -Fällung)	42
13.2.1.	Prinzip der Methode.....	42
13.2.2.	Durchführung.....	42
13.2.3.	Berechnung	42
14.	Coffein, Theophyllin, Theobromin.....	44
14.1.	Allgemeines.....	44
14.1.1.	Coffein	44
14.1.2.	Theophyllin	44
14.1.3.	Theobromin	44
14.2.	Rechtliche Regelungen	45
14.2.1.	Cola	45
14.2.2.	Kaffee	45
14.2.3.	Tee.....	45
14.3.	Aufgabe	45

14.3.1.	Cola	45
14.3.2.	Kaffee	45
14.3.3.	Tee.....	45
14.4.	Prinzip der Methode	46
14.5.	Durchführung.....	46
14.6.	Auswertung	47
14.7.	Vorbereitung auf den Versuch.....	47
15.	Backverbesserungsmittel	53
15.1.	Allgemeines.....	53
15.1.1.	Backmittel	53
15.1.2.	Inhaltsstoffe von Backmitteln.....	53
15.2.	Gesetzliche Regelungen	53
15.3.	Prinzip der Methode	54
15.3.1.	Mikrobackversuche.....	54
15.4.	Durchführung.....	54
15.4.1.	Teigbereitung.....	54
15.4.2.	Teiggärung.....	54
15.4.3.	Backen (thermische Umwandlung des Teiges in eine feste Backware)	55
15.5.	Zusätze.....	55
15.6.	Auswertung:	55
15.7.	Aufgabe	56
15.8.	Vorbereitung auf den Versuch.....	56

1. Blutaufbereitung

Die Gesamtmenge des im Körper zirkulierenden Blutes beträgt etwa 6-8 % des eigenen Körpergewichtes und entspricht für einen Erwachsenen ca. 4-6 l Blut. Das Blut (griech. Haema) setzt sich aus ca. 55 % Blutplasma (Serum und Plasmaproteine) und 45 % zellulären Bestandteilen (Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten) zusammen.

Für die einzelnen Versuche im Praktikum werden je eine Serummonovette (Granulat als Gerinnungsaktivator beschichtet), eine EDTA-Monovette (1,6 mg EDTA/ml Blut als Antikoagulans) und eine Fluorid-Monovette (1 mg Fluorid/ml Blut als Glykolyseinhibitor) abgenommen und aufgearbeitet.

Serummonovette (grau)	→ Lipid-Versuch
EDTA-Monovette (rot)	→ Hämatokrit-, Vitamin C-, Thiaminversuch
Fluorid-Monovette (gelb)	→ Glukose- und Laktatversuch

Schlagworte: Blutbestandteile und Funktion, Blutentnahme und -aufarbeitung, veränderte Blutparameter bei Erkrankungen

1.1. Geräte und Hilfsmittel

- | | |
|---|---|
| - Plasma- und Serum-
Blutentnahmeröhrchen | - Zentrifugen (15 ml Reaktionsgefäße) |
| - Serologische Pipetten (10 ml) +
Pipettierhilfe | - Hämatokrit-Zentrifuge |
| - 100-1000 µl Pipetten | - Hämatokrit-Kapillaren |
| - 1,5 ml + 2ml Reaktionsgefäße | - Hämatokrit-Versiegelungskitt |
| | - Blut-Abfallbehälter für Feststoffe und
Flüssigkeiten |

1.2. Chemikalien

- Isotonische Kochsalzlösung (0,9 g/100 ml; 154 mmol/l)
→ wird vom Betreuer bereitgestellt

1.3. Durchführung der Blutaufbereitung

1.3.1. Hämatokrit-Bestimmung

Aus den EDTA-Monovetten (rot) wird vorsichtig eine Hämatokrit-Kapillare zu $\frac{3}{4}$ mit Blut gefüllt (bis zur schwarzen Markierung). Anschließend wird die Kapillare sorgfältig mit Hämatokrit-Versiegelungskitt verschlossen (leicht drehend in den Kitt stecken) und mit der verschlossenen Seite nach außen in eine Kerbe der Hämatokrit-Zentrifuge eingelegt. Die Proben werden für 5 min bei 12000 U/min zentrifugiert und danach kann der Hämatokritwert mit Hilfe des Ablesegerätes bestimmt werden.

1.3.2. Gewinnung von Plasma

Die EDTA-Monovetten (rot) werden im Anschluss an die Hämatokritbestimmung für 10 min bei 2.500 x g zentrifugiert. Der Überstand (Plasma) zur weiteren Bestimmung von Vitamin C wird vollständig in 1,5 ml Reaktionsgefäße (jeweils 500 µl pro Reaktionsgefäß) überführt. Die Plasmaproben bis zur Verwendung bei -20°C einfrieren.

Die Fluoridmonovetten (gelb) für die Glukose- und Laktatbestimmung werden auf Eis gelagert und anschließend 10 min bei 2.500 x g (4 °C) zentrifugiert. 500 µl der Plasmaüberstände werden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die Proben bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

1.3.3. Waschung der Erythrozyten

Die verbleibenden korpuskulären Anteile den EDTA-Monovetten (rot) werden mit isotonischer Kochsalzlösung auf etwa 10 ml aufgefüllt, durch leichtes schwenken gemischt und zentrifugiert (2500 x g, 10 min). Der Überstand wird vorsichtig mit einer serologischen Pipette abgesaugt und verworfen. Anschließend wird wieder mit isotonischer Kochsalzlösung auf 10 ml aufgefüllt, gemischt, zentrifugiert und abgesaugt. Es folgt ein dritter und letzter Waschschrift, wobei die Zentrifugationszeit auf 15 min erhöht wird. Zum Schluss werden je 0,1 ml Erythrozyten in jeweils 0,45 ml isotonische Kochsalzlösung in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -20 ° eingefroren.

1.3.4. Gewinnung von Serum

Zur Gewinnung von Serum (enthält kein Fibrinogen im Gegensatz zum Plasma) muss die Koagulationszeit abgewartet werden. Vollblut bleibt mind. 30 min bei Raumtemperatur in den Entnahmeröhrchen stehen und wird anschließend zentrifugiert (2.500 x g, 10 min). Zum Schluss wird 1 ml des Überstandes in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Literatur

- Klaus Dörner: Klinische Chemie und Hämatologie; Thieme Verlag; 5. Auflage; 2003
- Thews, Mutschler, Vaupel: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 6. Auflage
- www.sarstedt.com (Tipps und Tricks in der Präanalytik)

2. Thiamin (Vitamin B1) – Transketolase (ETK) und α ETK in Erythrozyten

2.1. Einführung

Das wasserlösliche Thiamin und seine Phosphorsäureester werden unter dem Begriff Vitamin B₁ zusammengefasst. Chemisch handelt es sich um einen substituierten Pyrimidinring und einen Thiazolanteil, die über eine Methylengruppe miteinander verbunden sind.

Durch Phosphorylierung wird das Thiamin in seine aktive Wirkform – das Thiaminpyrophosphat (TPP) – überführt, welches als Coenzym insbesondere im Glukose- und Energiestoffwechsel der Zelle von Bedeutung ist.

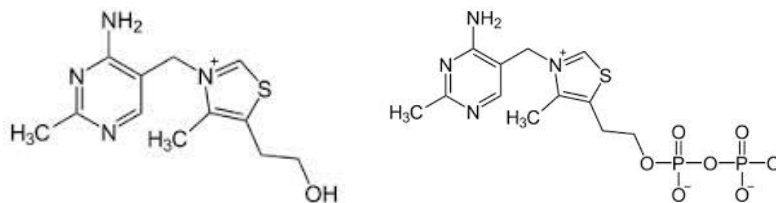


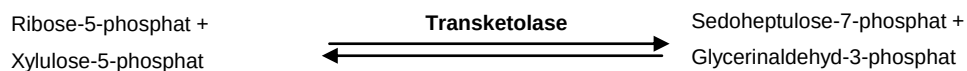
Abb. 1: Strukturformel von Thiamin (links) und Thiaminpyrophosphat (rechts)

Die Transketolase (EC 2.2.1.1) ist ein TPP-abhängiges Enzym, welches eine essentielle Rolle beim oxidativen Glukoseabbau spielt. Sie überträgt C₂-Einheiten von Ketosen auf Aldosen und stellt u.a. (zusammen mit der Transaldolase) eine reversible Verbindung des Pentosephosphatweges mit der Glykolyse her.

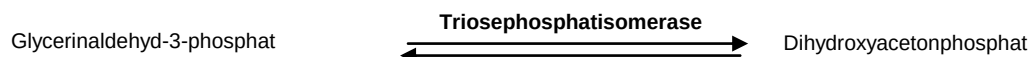
Die Bestimmung ihrer Aktivität bzw. des Quotienten aus stimulierter und unstimulierter Aktivität (α ETK) in den Erythrozyten ist der am häufigsten gebrauchte Parameter zur Bestimmung des Thiaminstatus, da von allen Geweben die roten Blutkörperchen als erstes von einem Thiaminmangel betroffen sind.

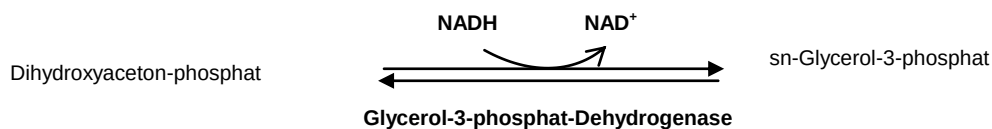
2.2. Methode

Ribose-5-phosphat und Xylulose-5-Phosphat (entsteht durch Isomerisierung aus Ribose-5-Phosphat) werden durch die Transketolase in Seduheptulose-7-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat umgesetzt.



Durch Zusatz von Triosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.1) wird das entstandene Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Dihydroxyaceton-phosphat isomerisiert, welches anschließend durch die sn-Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.8) und NADH als Cosubstrat zu sn-Glycerol-3-phosphat und NAD⁺ umgesetzt wird.





Die Oxidation von NADH zu NAD^+ führt aufgrund der unterschiedlichen Absorption der beiden Substanzen bei 340 nm zu einer Abnahme der Extinktion bei dieser Wellenlänge, die photometrisch gemessen werden kann. Die Transketolaseaktivität ergibt sich aus der Geschwindigkeit der Zunahme von Glycerinaldehyd-3-phosphat und ist proportional zum NADH-Umsatz.

Durch Zugabe von TPP zur Probe lässt sich die Transketolaseaktivität auf einen Optimalwert steigern (TPP-Effekt). Der Quotient aus der optimalen Enzym-Aktivität (mit TPP-Zusatz) und der tatsächlichen Enzym-Aktivität ohne (TPP-Zusatz) dient als Parameter für den Thiaminstatus.

TPP-Effekt:	0 – 14 %	zufrieden stellender Status
	15 – 24 %	marginaler Mangel
	> 25 %	mittlerer bis schwerer Mangel

2.3. Geräte

- Reaktionsgefäße
- Kunststoffküvetten (Schichtdicke: 1 cm)
- Wasserbad
- Photometer mit temperierbarer Küvettenhalter

2.4. Chemikalien

Alle Lösungen werden vom Betreuer vorbereitet. Die fehlenden Berechnungen sind vom Studenten im Vorfeld auszufüllen und werden am Versuchstag besprochen.

▪ 0,1 M Tris-Puffer(Trishydroxymethylaminomethan); pH 7,6

MW	Konzentration	Endvolumen	Tris	H ₂ O
121,14 g/ mol	0,1 M	50 ml	0,606 g	50 ml

0,606 g Tris werden in 30 ml H₂O lösen; pH auf 7,6 einstellen und auf 50 ml auffüllen

▪ 0,85 %ige Isotonische Kochsalzlösungen (NaCl)

MW	Konzentration	Endvolumen	NaCl	H ₂ O
58,44 g/ mol	0,85 %	500 ml	4,25 g	500 ml

▪ 0,3% Saponinlösung

Saponin	0,85 %ige NaCl
30 mg	10 ml

▪ **0,1 M Ribose-5-phosphat (R-5-P)**

MW	Konzentration	Endvolumen	R-5-P	0,1 M Tris
274,08 g/ mol	0,1 M	0,5 ml	...	...

▪ **0,001 M Thiaminpyrophosphat (TPP)**

MW	Konzentration	Endvolumen	TPP	0,1 M Tris
460,77 g/ mol	0,001 M	10 ml	...	...

▪ **0,0025 M NADH**

MW	Konzentration	Endvolumen	NADH	0,1 M Tris
709,4 g/ mol	0,0025	1 ml	...	...

▪ **Glycerin-Aldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GHD)/ Triosephosphatisomerase (TIM)**

→ gebrauchsfertige Lösung

2.5. Durchführung

2.5.1. Probenaufbereitung

Die Analysenprobe (verdünnte Erythrozyten) wird nach dem Auftauen am Analysentag mit 50 μ l Saponin-Lösung versetzt. Die Probe danach gut schütteln und 20 min im Dunkeln hämolysieren lassen.

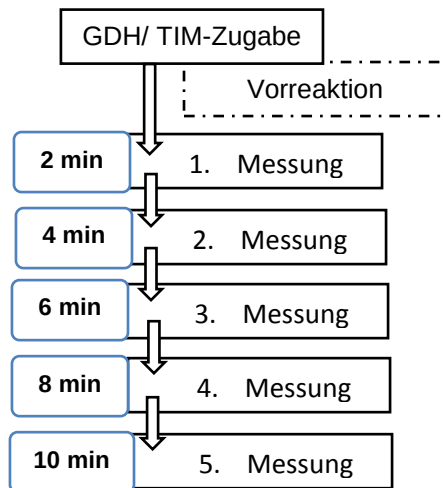
2.5.2. Probenansatz

- erfolgt als Doppelbestimmung, d.h. insgesamt 4 Küvetten
- die Ansätze 1 und 2 bzw. 3 und 4 werden gemeinsam in 15 ml-Röhrchen vorbereitet und 15 min bei 37 °C inkubiert

Zusammensetzung des Testansatzes	Ohne TPP-Zusatz (Küvette 1 und 2)	Mit TPP-Zusatz (Küvette 3 und 4)
Tris –Puffer (ml)	2,4	2,4
Hämolysat (μ l)	50	50
Ribose-5-Phosphat (μ l)	100	100
NADH (μ l)	100	100
TPP (μ l)	-	100
dest. Wasser (μ l)	150	50

- anschließend werden 10 μ l GDH/ TIM auf einen trockenen Rührspatel pipettiert (durch den Betreuer) und gleichzeitig zum Ansatz gegeben

Die Messung erfolgt spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm und einer Temperatur von 37 °C nach 2 min Vorreaktion. Die Reaktion wird während ihres linearen Teils ($t = 8$ min) aufgezeichnet, d.h. alle 2 min wird die Extinktion ermittelt (insgesamt 5 Messwerte für jede Küvette).



2.6. Auswertung

Die Auswertung erfolgt nach folgender Formel:

$$U/I = \frac{\Delta E}{\Delta t} * 9094 \mu\text{mol}/\text{min}$$

abgeleitet von:

$$U = \frac{\Delta c}{\Delta t}$$

$$U = \frac{\Delta E}{\Delta t * \epsilon * d}$$

$$U = \frac{\Delta E}{\Delta t * \epsilon * d} * \frac{V_T}{V_H} * 100$$

dE: Extinktionsdifferenz

dt: Zeitdifferenz (hier 8 cm)

d: Schichtdicke (hier 1 cm)

ϵ : Extinktionskoeffizient

von NADH bei 340 nm (6,18 l/mmol*cm)

VT: Volumen des Testansatzes (hier 2,8 ml)

VH: Volumen des eingesetzten Hämolsats (hier 0,05 ml)

1 U ist die Enzymmenge, die pro min 1 μmol Substrat umsetzt. Die Enzymaktivität lässt sich auch in Katal (kat) angeben. 1 kat ist die Enzymmenge, die pro s 1 mol Substrat umsetzt.

Umrechnung: 1 kat = 6×10^7 U

Der Aktivierungskoeffizient (AK) ergibt sich aus dem Quotient:

$$AK = \alpha_{ETK} = \frac{U/I \text{ mit TPP}}{U/I \text{ ohne TPP}}$$

Literatur

- Pietrzik K., Golly I., Loew D. „Handbuch Vitamine: für Prophylaxe, Therapie und Beratung ; 94 Tabellen“; Elsevier Urban & Fischer; 1. Auflage (2008).
- Lieberman M., Marks A.D. „Basic Medical Biochemistry – A Clinical Approach“; Lippincott Williams & Wolters Kluwer business; 4. Auflage (2013).
- Zemleni J., Rucker R.B., McCormick D.B., Suttie J.W. „Handbook of Vitamins“; CRC Press; 4. Auflage (2007).

3. Vitamin-C–Bestimmung im Blutplasma

3.1. Allgemeines

Unter dem Namen Vitamin C werden L-Ascorbinsäure (Summenformel $C_6H_8O_6$), L-Ascorbat-Monoanion, Semidehydro-L-Ascorbinsäure (SDA) und Dehydro-L-Ascorbinsäure (DHA) zusammengefasst.

Zentraler Bestandteil der Moleküle ist ein nahezu planarer Fünfring. Basierend auf ihrer Endiolstruktur – zwei über eine Doppelbindung verknüpfte Kohlenstoffatome – kann die Ascorbinsäure Reduktionsäquivalente (Elektronen) für eine Vielzahl von biochemischen Reaktionen zur Verfügung stellen. Die starke Wirkung der Substanz als intra- und extrazelluläres Reduktionsmittel kann auf diese als Redukton bezeichnete Gruppierung zurückgeführt werden.

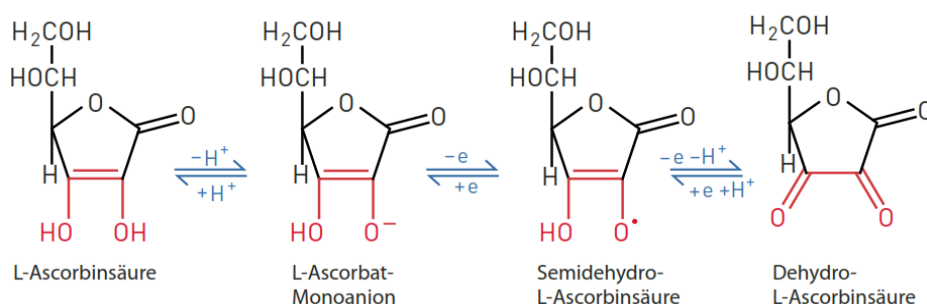


Abbildung 1 Strukturformeln von Ascorbinsäure und ihrer Oxidationsprodukte

Dehydroascorbinsäure ist kein stabiles Produkt und zerfällt schnell in Oxalat und Threonat sowie anderen Oxidationsprodukten. Es kann durch Öffnung des Lactonringes spontan zu einem weiteren Produkt konvertieren, der 2,3-Diketogulonsäure.

Die Bestimmung von Ascorbinsäure im Blutplasma dient der Analyse der Vitamin-C–Versorgung beim Menschen.

3.2. Prinzip der Methode

Ascorbinsäure wird in einer kupferkatalysierten Reaktion zu Dehydroascorbinsäure oxidiert und mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu einem orangenen Farbkomplex umgesetzt, der photometrisch bestimmt wird. Mittels Trichloressigsäure (TCA) wird der pH-Wert der Probe reduziert, L-Ascorbinsäure stabilisiert und Plasmaproteine ausgefällt. Nachfolgend wird der Probenüberstand mit Dinitrophenylhydrazin-(DNP)-Reagenz versetzt. Dieses Reagenz besteht aus einer äquivalenten Menge an Thioharnstoff- und Kupfersulfat-Lösung sowie aus 20 VT 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung. In einer durch das Kupfersulfat katalysierten Reaktion wird die Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure oxidiert. Die Thioharnstoff-Lösung fängt dabei überschüssige Kupferionen und andere oxidierende Agenzien (z.B. Eisenionen) in Komplexen ab und macht sie somit unschädlich für die Ascorbinsäure. Die entstandene Dehydroascorbinsäure reagiert im Anschluss unter schwefelsauren Bedingungen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin.

Dabei findet eine Kondensationsreaktion statt, bei der die Ketogruppen der Ascorbinsäure mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazin reagieren und so das Bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon gebildet wird.

Die optischen Eigenschaften des Hydrazons können photometrisch bestimmt werden.

Neben Dehydroascorbinsäure werden auch L-Ascorbinsäure und 2,3-Diketogulonsäure mit dieser Methode erfasst, daher wird von einer Total-Ascorbinsäurebestimmung gesprochen.

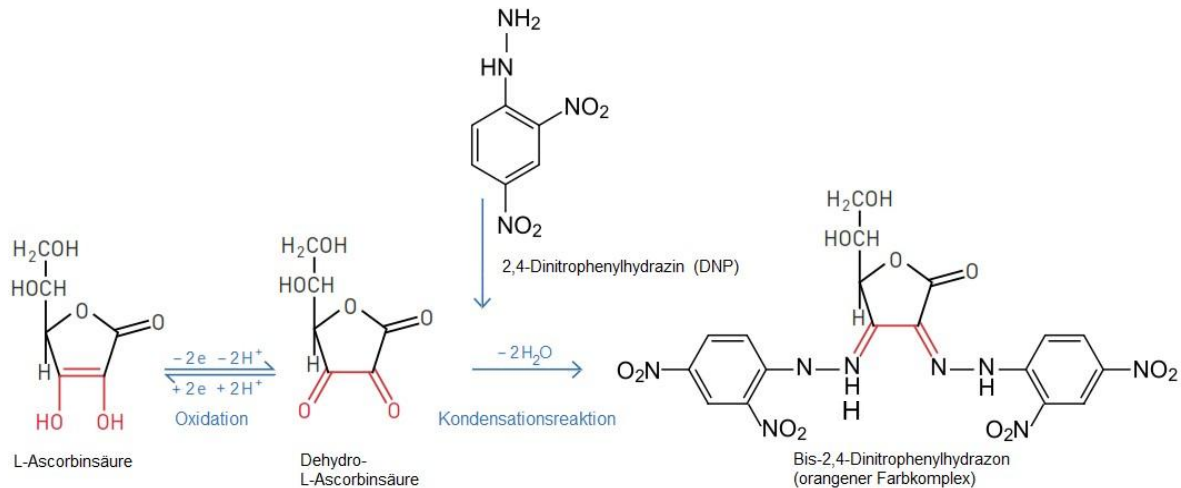


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Prinzips der Vitamin-C-Bestimmung

Probe

400 µL Blutplasma

Verbrauchsmaterial/Geräte

- | | |
|---|---|
| - Einkanalpipetten (100-µL, 200-µL, 1000-µL) | - Schutzhandschuhe, puderfrei |
| - Einmalküvetten (Polystyrol, Halbmikro 1.5-3 mL) | - Spectralphotometer (Varian Cary 3 UV-Visible) |
| - Feinwaage (BP221S) | - Vortex |
| - Pipettenspitzen (100-µL, 200-µL, 1000-µL) | - Wärmeschrank |
| - Reaktionsgefäße (1.5-mL, 2-mL, 15-mL) | - Zentrifuge (Biofuge Pico) |
| - Reaktionsgefäß-Ständer | |
| - Schutzbrille | |

Chemikalien

Vorbereitung durch den Versuchsleiter:

- | | |
|----------------------|--|
| - Schwefelsäure, 9 N | 3 VT (75.5 mL) dest. H_2O / 1 VT (24.5 mL) H_2SO_4
Lagerung: RT, vor Versuchsbeginn: Eisbad |
| - Messchwefelsäure | 7 VT (157.5 mL) konz. H_2SO_4 / 1 VT (22.5 mL) dest. H_2O
Lagerung: RT |

- | | |
|------------------------------------|---|
| - TCA-Lösung | 25 g TCA/ 500 mL dest. H ₂ O
Lagerung: RT |
| - Thioharnstoff-Lösung | 5 g Thioharnstoff/ 100 mL dest. H ₂ O
Lagerung: RT |
| - Kupfer(II)sulfat-Lösung | 0,6 g CuSO ₄ ·5H ₂ O/ 100 mL dest. H ₂ O
Lagerung: RT |
| - 2,4-DNP-Lösung | 0,55 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin/ 25 mL 9 N H ₂ SO ₄
Vor Gebrauch filtrieren
Lagerung: 4 °C, 3 Wochen |
| - Ascorbinsäure-Stammlösung, | 0,1 mg Ascorbinsäure/mL TCA-Lösung
25 mg Ascorbinsäure
250 mL TCA-Lösung
Lagerung: -20 °C/-80 °C |
| - Qualitätskontroll-Stammlösung, | 0,1 mg Ascorbinsäure/mL TCA-Lösung
10 mg Ascorbinsäure/ 100 mL TCA-Lösung |
| - Qualitätskontroll-Arbeitslösung, | 10 µg Ascorbinsäure/mL TCA-Lösung
10 mL Qualitätskontroll-Stammlösung/100 mL TCA-Lösung
Lagerung: -20 °C/-80 °C |

- DNP-Reagenz
 - 1 VT Thioharnstoff-Lösung
 - 1 VT Kupfer(II)sulfat-Lösung
 - 20 VT 2,4-DNP-Lösung
 - 75 µL Thioharnstoff-Lösung/75 µL Kupfer(II)sulfat-Lösung/
 - 1500 µL 2,4-DNP-Lösung
 - Von jeder Gruppe herzustellen (in 2-mL-Reaktionsgefäßen)
 - Lagerung: 4 °C, 1 Woche
- Ascorbinsäure-Kalibrierlösungen, 2/6/12/20 µg Ascorbinsäure/mL dest. H₂O
 - Von jeder Gruppe herzustellen (in 1.5-mL-Reaktionsgefäßen nach Tabelle 1)

Kalibrierung	C _L -Ascorbinsäure [µg/mL]	V _L -Adcorbinsäure-Stammlösung [µL]	V _{dest. H₂O} [µL]	V _{total} [µL]
S1	2	20	980	1000
S2	6	60	940	1000
S3	12	120	880	1000
S4	20	200	800	1000
S5	30	300	700	1000
S6	42	420	580	1000

3.3. Durchführung

Der Probenansatz sowie die Kalibrierlösungen erfolgen als Doppelbestimmungen. Die Qualitätskontroll-Lösung und der Blindwert werden als Einfachbestimmungen mitgeführt.

Zunächst soll jede Gruppe das DNP-Reagenz sowie die Ascorbinsäure-Kalibrierlösungen frisch herstellen. Die einzelnen Ansätze (insgesamt 16) werden in 1.5-mL-Reaktionsgefäßen für die entsprechende Doppel- bzw. Einfachbestimmungen vorbereitet. Es werden jeweils 200 µL Blutplasma (Probe), 200 µL Qualitätskontroll-Lösung, 200 µL dest. H₂O (Blindwert) und je 200 µL der Ascorbinsäure-Kalibrierlösungen mit 300 µL TCA-Lösung versetzt. Die Ansätze werden kräftig geschüttelt und anschließend 5 min bei 12 000 U/min zentrifugiert. Es werden jeweils 300 µL des Probenüberstandes mit 100 µL DNP-Reagenz versetzt und gemischt. Es erfolgt eine Temperierung der Ansätze für 1 Stunde bei 60 °C mit anschließender Kühlung im Eisbad für 5 min. Die Ansätze werden mit 400 µL Messschwefelsäure versetzt, kräftig gemischt und darauffolgend für 20 min dunkel gestellt (siehe Abbildung 3).

Die Messung erfolgt spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 520 nm.

3.4. Berechnung/Auswertung

Die als Doppelbestimmung durchgeführte Absorption der Probe sowie der Kalibrierlösungen wird gemittelt. Die Absorption des Blindwertes wird jeweils von der gemittelten Absorption der Probe und der der Kalibrierstandardlösung sowie der einfach bestimmten Absorption der Qualitätskontrolle subtrahiert. Anhand der linearen Regression der Standardkonzentrationen kann der Vitamin-C-Gehalt der Probe sowie der Qualitätskontrolle berechnet werden. Die Angabe des Vitamin-C-Wertes der Ansätze erfolgt in mg/dL Probe. Er trifft eine Aussage über die Vitamin-C-Menge, die das Blutplasma bzw. die Qualitätskontrolle enthält.

Der gemessene Vitamin-C-Gehalt der Plasmaprobe soll mit dem Referenzbereich für Vitamin C (0.4-1.8 mg/dL Plasma) abgeglichen und gegebenenfalls Abweichungen zum minimalen bzw. maximalen Wert berechnet werden (je nachdem, ob der gemessene Wert für Vitamin C höher oder niedriger ist, als der minimale bzw. maximale Wert des Referenzbereiches).

Weiterhin soll die Abweichung des gemessenen Vitamin-C-Gehaltes der Qualitätskontrolle von dem erwarteten errechnet werden. Dieser Messfehler gibt einen Hinweis darauf, inwieweit der gemessene Vitamin-C-Gehalt der Probe von dem tatsächlichen –Gehalt abweicht. Dahingehend kann der Messfehler des Vitamin-C-Gehaltes der Plasmaprobe berücksichtigt werden.

Eventuelle Fehlerquellen (Handling während des Versuchs, Methodenspezifische Probleme) sowie die Qualität der Ergebnisse sollen diskutiert werden.

Weicht die Konzentration mehr als 10 % vom Sollwert ab, wird die gesamte Charge wiederholt. (Allgemeiner Hinweis, wird im Praktikum nicht durchgeführt.)

Übersicht über die Durchführung der Vitamin-C-Bestimmung

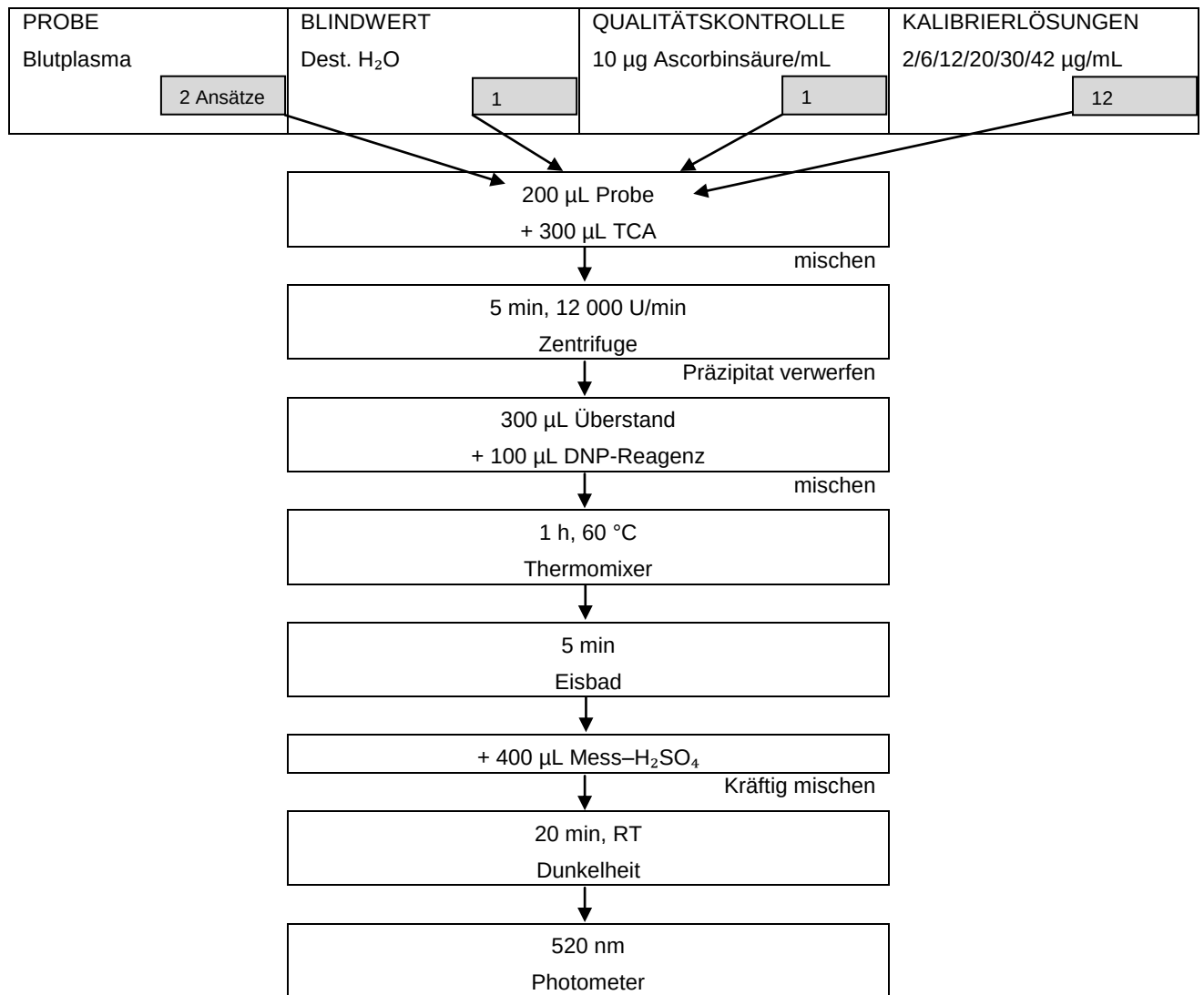


Abbildung 3 Übersicht über die Durchführung der Vitamin-C-Bestimmung

Literatur

- Heseker H, Stahl A. Vitamin C: Physiologie, Vorkommen, Analytik, Referenzwerte und Versorgung in Deutschland. Ernährungs-Umschau. 2010, 3.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. New York : Oxford University Press, 2004.
- Watzl B, Leitzmann C. Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. 3. Aufl. Stuttgart : Hippokrates, 2005.
- Dhariwal KR, Hartzell WO, Levine M. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurements in human plasma and serum. Am J Clin Nutr 1991; 54: 712-6.
- Roe JH, Kuether CA. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. J. Biol. Chem. 1943, 147:399-407.

4. Lipide und Lipoproteine

4.1. Lipidstatus (LDL, HDL, TG) im Serum

4.1.1. Charakteristik und Transport der Blutlipide

Im wässrigen Milieu des Blutes sind Fette und fettähnliche Substanzen unlöslich. Daher werden Triglyceride, Cholesterol, Phospholipide und ein Teil der fettlöslichen Vitamine ausschließlich in Form von Lipid-Protein-Komplexen (Lipoproteinen) transportiert, wobei sechs Lipoproteinklassen unterschieden werden: Die **Chylomikronen** transportieren hauptsächlich die mit der Nahrung aufgenommenen (exogenen) Triglyceride. Sie werden normalerweise innerhalb von 20-30 Minuten zu den triglyceridarmen **Chylomikronen-Remnants** abgebaut. Mit den **VLDL** (Very Low Density Lipoproteins) werden über 90 % der endogenen Triglyceride transportiert. Die VLDL werden durch Einwirken der Lipoproteinlipase über die **IDL** (Intermediate Density Lipoproteins) zu den **LDL** (Low Density Lipoproteins) abgebaut. Die LDL spielen die entscheidende Rolle beim Cholesteroltransport zu den nichthepatischen Geweben, während die **HDL** (High Density Lipoproteins) für den reversen Cholesteroltransport von den peripheren Geweben zurück zur Leber.

Unter allen Risikofaktoren spielen Fettstoffwechselstörungen wie bspw. Hypercholesterolämien oder Hypertriglyceridämien eine entscheidende Rolle in der Pathogenese atherosklerotischer Gefäßerkrankungen, insbesondere der koronaren Herzkrankheit. Mehrere Untersuchungen belegen, dass mit zunehmendem Serumcholesterolkonzentrationen das Risiko für eine koronare Herzkrankheit steigt.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass die atherogene Bedeutung des Gesamtcholesterols differenziert gesehen werden muss. Aufgrund zahlreicher epidemiologischer und klinischer Studien werden die LDL, die ca. 70 % des Gesamtcholesterols transportieren, als die wichtigsten atherogenen Lipoproteine angesehen. Ihre Erhöhung bedeutet ein besonderes Risiko. Im Gegensatz zu den LDL stellt eine Erhöhung der zweiten cholesterolreichen Klasse, der HDL, jedoch kein Risiko dar. Ganz im Gegenteil wurde festgestellt, dass zwischen koronarer Herzkrankheit und HDL- bzw. HDL-Cholesterolkonzentration eine inverse Beziehung besteht, da

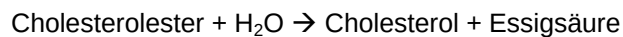
1. HDL-Cholesterol von den peripheren Zellen in die Leber transportiert und damit überschüssiges Cholesterol zurück zur Leber bringt,
2. HDL die LDL-Aufnahme in die Zelle hemmt und bei hohen HDL-Konzentrationen die triglyceridreichen Lipoproteine und deren atherogenen Zwischenprodukte schneller aus dem Plasma eliminiert werden.

Die Ermittlung des Cholesterol- und Triglyceridspiegels im Serum ist deshalb ein erster wichtiger Schritt, der Anhaltspunkte für therapeutische und diätetische Maßnahmen liefern kann und dem sich eine weitere Differenzierung nach dem jeweiligen „Lipoproteinmuster“ anschließen sollte, auf Grund dessen einzig und allein präzise Aussagen über die jeweils vorliegende Form der Hyperlipoproteinämie bzw. Dyslipoproteinämie möglich sind.

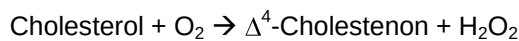
4.2. Bestimmung des Gesamtcholesterols im Serum (CHOD-PAP-Methode)

4.2.1. Methode und Reaktionsprinzip

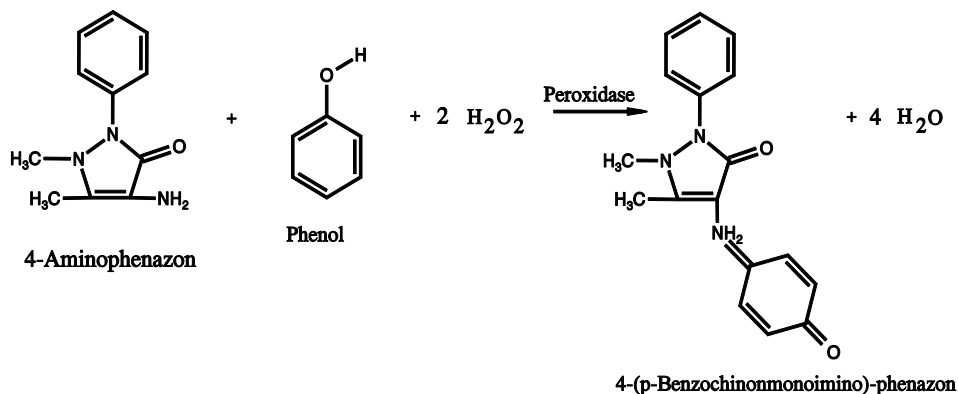
Die im Serum vorhandenen Cholesterolester werden unter Einwirkung einer Cholesterolesterase in Cholesterol und Fettsäuren gespalten. Das freie Cholesterol wird mittels Sauerstoff unter Mitwirkung einer Cholesteroloxidase zu Δ^4 -Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet mit 4-Aminophenazon und Phenol unter katalytischer Wirkung einer Peroxidase einen roten Farbstoff, dessen Farbintensität der Cholesterolkonzentration direkt proportional ist und bei 470-560 nm spektralphotometrisch gemessen werden kann.



Enzym: Cholesterol-Esterase



Enzym: Cholesterol-Oxidase (CHOD)



Geräte und Hilfsmittel

- Photometer
- Reagenzglasschüttler
- Reaktionsgefäße
- Kunststoffküvetten, halbmikro, 1 cm Schichtdicke

Chemikalien

- Reagenz (CHOL)
- Haltbarkeit: geöffnet bei +2 bis +8 °C 4 Wochen

4.2.2. Durchführung

In beschriftete Reaktionsgefäße pipettieren (in dieser Reihenfolge):

		Reagenzienblindwert (1x)	Probe (3x)
Dest. Wasser	(mL)	0,01	-
Serum	(mL)	-	0,01
Reagenz (CHOL)	(mL)	1,00	1,00

Anschließend wird auf dem Reagenzglasschüttler gemischt und Blindwert und Probe werden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Innerhalb von 1 h ist die Extinktion der Probe gegen den Blindwert bei 546 nm zu messen ($= E_{\text{Probe}}$).

4.2.3. Auswertung

Der Blindwert wird vom Messwert abgezogen.

Die Gesamtcholesterolkonzentration wird nach folgender Formel berechnet:

$$c [\text{mg/dl}] = 853 \times E_{\text{Probe}}$$

Diese Formel gilt nur für Messungen bei 546 nm.

4.3. Bestimmung von HDL-Cholesterol im Serum (CHOD-PAP-Methode)

4.3.1. Methode

Durch Zugabe von Phosphorwolframsäure und Magnesiumionen zur Probe werden die Chylomikronen, VLDL und LDL ausgefällt. Nach Zentrifugation verbleiben im Überstand die HDL, deren Cholesterolkonzentration enzymatisch bestimmt wird.

4.3.2. Geräte und Hilfsmittel

- Reaktionsgefäße
- Reagenzglasschüttler
- Zentrifuge
- Photometer
- Kunststoffküvetten, halbmikro, 1 cm Schichtdicke

4.3.3. Chemikalien

- **Fällungsreagenz:** Phosphorwolframsäure 0,55 mmol/l
Magnesiumchlorid 25 mmol/l
- **Reagenzlösung:** siehe 4.2.3

4.3.4. Durchführung

Präzipitation

In beschriftete Reaktionsgefäße pipettieren (3-fach Bestimmung):

Serum	0,2 mL
Fällungsreagenz	0,5 mL

Der Ansatz wird auf dem Reagenzglasschüttler gemischt, 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen und dann 2 min mit ca. $13.700 \times g$ (12.000 U/min, Heraeus Biofuge Pico) zentrifugiert. Der klare Überstand wird anschließend innerhalb von 2 h vom Rückstand abgetrennt und für die Bestimmung des HDL-Cholesterols eingesetzt. Diese so vorbereitete Analysenlösung (Überstand) ist bei + 2 bis + 25°C 5 Tage haltbar.

Probenansatz

In beschriftete Reaktionsgefäße pipettieren:

	Reagenzienblindwert (1x)	Probe (3x)
Dest. Wasser (mL)	0,1	-
Überstand (mL)	-	0,1
Reagenz (CHOL) (mL)	1,0	1,0

Nun wird auf dem Reagenzglasschüttler gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann innerhalb von 1 h die Extinktion der Probe gegen den Blindwert bei 546 nm ermittelt.

4.3.5. Auswertung

Der Blindwert wird vom Messwert abgezogen.

Der Gehalt an HDL-Cholesterol wird nach folgender Formel ermittelt:

$$c \text{ [mg/dl]} = 325,1 \times E_{\text{Probe}}$$

Diese Formel gilt nur für Messungen bei 546 nm. Eine erhöhte Ascorbinsäurekonzentration im Serum führt bei dieser Methode zu reduzierten Wiederfindungen.

4.4. Triglycerid-Bestimmung im Serum (GPO-PAP-Methode)

4.4.1. Methode

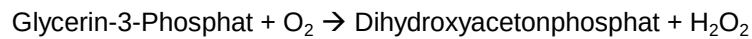
Die Triglyceride (TG) werden enzymatisch gespalten. Das entstandene Glycerin wird in einer sich anschließenden Farbreaktion bestimmt.



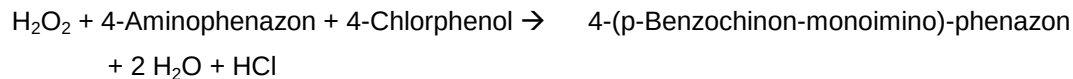
Enzym: Lipase



Enzym: Glycerokinase



Enzym: Glycerinphosphat-Oxidase (GPO)



Enzym: Peroxidase

Im ersten Schritt werden die Triglyceride durch eine Lipase gespalten. Das entstandene Glycerin wird nun in der Glycerokinase-reaktion phosphoryliert. Durch Glycerinphosphat-Oxidase katalysiert wird dann das zur PAP-Reaktion benötigte H_2O_2 unter Einwirkung von Sauerstoff auf Glycerin-3-Phosphat gebildet. H_2O_2 reagiert darauf, durch Peroxidase katalysiert, in der Indikatorreaktion mit 4-Chlorphenol und 4-Aminophenazon zu einem Farbstoff, der spektralphotometrisch bei 546 nm gemessen wird.

Geräte und Hilfsmittel

- Photometer
- Reagenzglasschüttler
- Reaktionsgefäße
- Kunststoffküvetten, halbmikro, 1 cm Schichtdicke

Chemikalien

- Reagenz (TG)
Haltbarkeit: geöffnet bei +2 bis +8 °C 14 Tage
Haltbarkeit der Probe bei -20 °C 4 Monate , bei +4 °C 3 Tage

4.4.2. Durchführung

In beschriftete Reaktionsgefäße pipettieren:

	Reagenzienblindwert (1x)	Probe (3x)
Dest. Wasser (mL)	0,01	-
Serum (mL)	-	0,01
Reagenz (TG) (mL)	1,00	1,00

Der jeweilige Ansatz wird auf dem Reagenzglasschüttler gemischt, 5 min bei 37 °C inkubiert und dann innerhalb von 30 min photometrisch (Probe gegen Blindwert) bei 546 nm gemessen.

4.4.3. Auswertung

Der Blindwert wird vom Messwert abgezogen.

Die Triglycerid-Konzentration im Serum wird nach folgender Formel ermittelt:

$$c \text{ [mg/dl]} = 1496 \times E_{\text{Probe}} \quad (1496 = c_{\text{Standard}}/E_{\text{Standard}})$$

Diese Formel gilt nur für Messungen bei 546 nm.

4.5. Berechnung des LDL-Cholesterols

Die LDL-Cholesterolkonzentration des Serums wird mit den bisher ermittelten Werten nach folgender Gleichung (Friedewald-Formel) berechnet:

$$\text{LDL-Cholesterol [mg/dl]} = \text{Gesamt-Cholesterol} - \frac{\text{Triglyceride}}{5} - \text{HDL-Cholesterol}$$

Hinweis: Besser ist die direkte LDL-Cholesterolbestimmung.

4.6. Auswertung

Zur Auswertung werden die gemessenen Daten grafisch unter Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen dargestellt. Zusätzlich wird auf mögliche Fehler und Ungenauigkeiten der eingesetzten Verfahren eingegangen.

Es erfolgt eine kurze Diskussion der einzelnen Parameter mit Hinblick auf ihre ernährungsphysiologische Bedeutung.

5. Glukosekonzentration und L-Laktat-Konzentration im Blutplasma

5.1. Glukosekonzentration

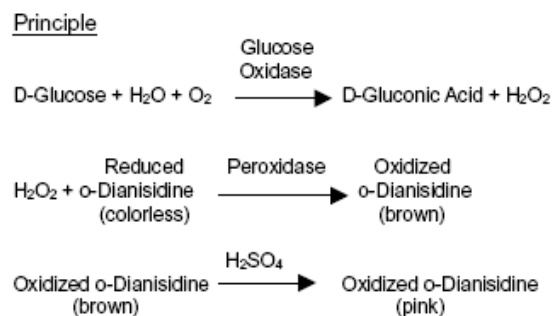
5.1.1. Einführung

Zucker stellt die Hauptenergiequelle für alle Körperzellen dar und wird über das Blut in alle Zielgewebe transportiert. Damit die Zellen kontinuierlich mit Zucker versorgt werden, liegt die Konzentration des Blutzuckers nahezu gleich bleibend bei 3,9-5,6 mmol/l (70 bis 100 mg/dl) und ist bei gesunden Menschen durch die Ausschüttung von Insulin bzw. Glucagon fein ausbalanciert. Nach einer Kohlenhydratreichen Mahlzeit kann der Blutzucker Spitzen von 8,9 mmol/l (160 mg/dl) erreichen und liegt normalerweise nach etwa 2 h unter 7,8 mmol/l (140 mg/dl). Bei Menschen mit Diabetes mellitus ist der natürliche Regelmechanismus zur Ausbalancierung der Glucose-konzentration im Blut gestört oder außer Kraft gesetzt. Sowohl Unter- als auch Überzuckerung können verhindert werden, wenn der Blutzuckerspiegel regelmäßig überwacht wird. Beide Zustände können langfristig zu schweren Organschäden und bei akuter Form und Nichtbehandlung zum Tode führen.

Die Messung des Blutzuckerspiegels stellt sowohl für den Patienten, zur optimalen Einstellung des Stoffwechsels, als auch zur frühzeitigen Diagnose eines Diabetes mellitus für den Arzt, eine einfache und wichtige Methode dar.

5.1.2. Methode

Die Detektion der Glukose erfolgt durch die im Schema dargestellten aufeinander folgenden Reaktionsschritte.



Die Intensität der pinken Farbe ist proportional zur Glucosekonzentration und wird zum Schluss photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm erfasst.

Geräte und Hilfsmittel

- | | |
|---|------------------------|
| - 1,5 ml Reaktionsgefäße + Ständer | - Photometer |
| - 15 ml Reaktionsgefäße + Ständer | - 100-1000 µl Pipetten |
| - Halbmikroküvetten (1 cm Schichtdicke) | - 10-100 µl Pipetten |
| - Rührspatel | - Schutzbrille |
| - Küvettenständer | - Stoppuhr |
| - Inkubator (37 °C) | - Vortexer |

Chemikalien und Reagenzien

- **Glucose Oxidase/Peroxidase (1 Kapsel + 39,2 ml H₂O)** Sigma; G3660
(1 Monat bei 2-8 °C und 6 Monate bei -20 °C stabil)
- **o-Dianisidine Reagenz (5 mg/ml in dH₂O)** Sigma; F5803
(in Lösung 3 Monate bei 2-8 °C stabil)
- **Glucose Standard (1 mg/ml in 0,1 % Benzoesäure; 5 ml)** Sigma; G3285
(mind. 6 Monate bei 2-8 °C stabil)
- **12 N (6 M) Schwefelsäure**

5.1.3. Durchführung

Die Plasmaprobe wird auf Eis aufgetaut, mit dH₂O 1:20 (Endvolumen 600 µl) verdünnt und gut durchmischt. Die Glucosestandards 0, 20, 40, 60, 80 µg/ml aus der 1 mg/ml Stocklösung wie im Pipettierschema errechnet herstellen und gut durchmischen (Endvolumen 500 µl).

c [µg/ml]	Verdünnung	Glucose STD [µl]	dH ₂ O [µl]
0	-	0	500
20			
40			
60			
80			

Bitte vor Versuchsbeginn ausfüllen!

Je 200 µl des Blindwerts (dH₂O), der Standards und der verdünnten Probe (Doppelbestimmung) werden wie im Schema beschrieben in Halbmikroküvetten vorgelegt.

Küvette	Reagenz	Volumen
1	Blank (dest. H ₂ O)	200 µl
2	Standard (20 µg/ml)	200 µl
3	Standard (40 µg/ml)	200 µl
4	Standard (60 µg/ml)	200 µl
5	Standard (80 µg/ml)	200 µl
6	Probe (1:20 Verdünnung)	200 µl
7	Probe (1:20 Verdünnung)	200 µl

Die zur Verfügung gestellte Glucose Oxidase/Peroxidase wird 1:50 mit der o-Dianisidine-Lösung versetzt (Endvolumen 3 ml) und gut durchmischt. Anschließend werden jeweils 400 µl des Glucose Oxidase/Peroxidase/ o-Dianisidine Gemisches zu den vorgelegten 200 µl Probe in die Küvetten gegeben, mit einem Rührspatel durchmischt für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation werden jeweils 400 µl einer 12 N Schwefelsäure zu den Küvetten gegeben (Schutzbrille tragen!) und wiederum mit einem Rührspatel durchmischt. Zum Schluss erfolgt die photometrische Detektion des gebildeten Farbstoffes bei 540 nm.

5.1.4. Auswertung

Die Absorption der gemessenen Standards wird in einem Diagramm gegen die Konzentration aufgetragen und die Standardgerade (Eichkurve) bestimmt. Der Mittelwert der beiden Analyseproben wird mithilfe der Geradengleichung und unter Beachtung möglicher Verdünnungsschritte in die entsprechende Glukosekonzentration umgerechnet und kann nun bewertet werden.

Literatur

- Arbeitsanweisung Glucose-Kit von Sigma (Nr.: GAGO-20)
- „Leitlinie für die postprandiale Diabeteseinstellung“ (International Diabetes Federation)
- “Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia” (World Health Organization)

5.2. L-Laktat-Konzentration im Plasma

5.2.1. Einführung

Laktate entstehen durch Abpufferung von Milchsäure im Stoffwechsel von Lebewesen, die bei der anaeroben Glykolyse (Milchsäuregärung) entsteht. Steht dem Muskel unter hoher Belastung nicht genügend Sauerstoff zur Verfügung, wird die fehlende Energie (in Form von ATP) über die Milchsäuregärung gebildet. So können im Vergleich zur vollständigen Oxidation von Glukose, über die anaerobe Glykolyse netto nur 2 mol ATP gebildet werden. Bei langanhaltender Belastung kann das gebildete Laktat nicht ausreichend eliminiert werden und führt zunehmend zur Übersäuerung der Muskulatur (wird z. B. bei der Bestimmung der Laktatleistungskurve in der Sportmedizin genutzt). Im Plasma können unter normalen Bedingungen Laktatkonzentrationen von 0.5 - 2.2 mmol/l (entspricht 4,5-19,8 mg/dl) gefunden werden, die bei hoher Belastung auch deutlich über die anaerobe Schwelle von 4 mmol/l gehen können.

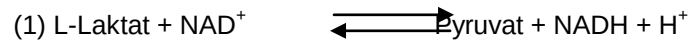
Laktat wird bestimmt:

- zur Verlaufsbeurteilung von Kreislaufschock und Vergiftungen,
- zur Erkennung von Gewebshypoxien,
- zur Klärung unklarer metabolischer Azidosen,
- bei Gelenksergüssen und
- zur Beurteilung der körperlichen Leistungsfähigkeit und Trainingssteuerung

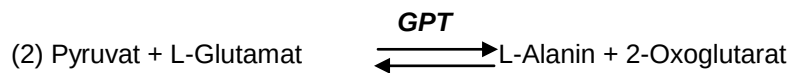
5.2.2. Prinzip der Messung

L-Milchsäure (L-Laktat) wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart von L-Laktat-Dehydrogenase (L-LDH) zu Pyruvat oxidiert (1).

LDH



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite von L-Laktat. Es kann jedoch durch Abfangen des Pyruvats mit Hilfe der nachgeschalteten Reaktion mit dem Enzym Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) in Gegenwart von L-Glutamat auf die Seite von Pyruvat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ verschoben werden (2).



Die während der Reaktion (1) gebildete NADH-Menge ist der L-Laktat-Menge äquivalent. Durch Bestimmung der Absorption bei 340 nm kann die gebildete Menge $\text{NADH} + \text{H}^+$ und damit die L-Laktat-Menge ermittelt werden.

Material

- 1,5 ml Reaktionsgefäße + Ständer
- Halbmikroküvetten (1 cm Schichtdicke)
- Rührspatel
- Küvettenständer
- Photometer
- 100-1000 µl Pipetten
- 10-100 µl Pipetten
- Stoppuhr
- Vortexer
- dH₂O

Chemikalien

- **L-Milchsäure-Standard (40 mg/dl)**
- **L-Lactic acid Kit** (Nr. 10 139 084 035; Boehringer Mannheim/R-Biopharm; Roche)

Bezeichnung	Volumen/ Menge	Vorbereitung	Haltbarkeit
Glycylglycine buffer solution	30 ml	gebrauchsfertig; auf Raumtemp. bringen	stabil bei 2-8°C
NAD-lyophilisat	210 mg	in 6 ml dH ₂ O lösen	3 Wochen (2-8°C) 3 Monate (-14- -25°C)
Glutamate-Pyruvate-Transaminase-Suspension (GPT)	0,7 ml	gebrauchsfertig	stabil bei 2-8°C
L-lactat acid dehydrogenase-solution (L-LDH)	0,7 ml (3800 U)	gebrauchsfertig	stabil bei 2-8°C

5.2.3. Durchführung

Die Laktat-Plasmaprobe wird auf Eis aufgetaut, mit dH₂O 1:10 (Endvolumen 1,5 ml) verdünnt und gut durchmischt. Die nötigen Laktatstandards 0, 8, 40, 80, 160 µg/ml werden aus der 40 mg/dl Stocklösung, wie im Pipettierschema berechnet, in 1,5 ml Reaktionsgefäßen hergestellt und gut durchmischt.

c [$\mu\text{g/ml}$]	Verdünnung	Laktat STD [μl]	dH ₂ O [μl]
0	-	0	1000
8			
40			
80			
160			

Bitte vor Versuchsbeginn ausfüllen!

Je 500 μl des Blindwerts (dH₂O), der Standards und der verdünnten Probe (Doppelbestimmung) werden wie im Schema beschrieben in Halbmikroküvetten vorgelegt.

Küvette	Reagenz	Volumen
1	Blank (dest. H ₂ O)	500 μl
2	Standard (8 $\mu\text{g/ml}$)	500 μl
3	Standard (40 $\mu\text{g/ml}$)	500 μl
4	Standard (80 $\mu\text{g/ml}$)	500 μl
5	Standard (160 $\mu\text{g/ml}$)	500 μl
6	Probe (1:10 Verdünnung)	500 μl
7	Probe (1:10 Verdünnung)	500 μl

Zusätzlich werden in jede Küvette 500 μl Glycylglycinpuffer, 100 μl NAD-lyophilisat und 10 μl GPT-Lösung zugegeben und mit einem Rührspatel gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Absorption (**E1**) bei 340 nm gemessen. Nach der Messung erfolgt die Zugabe von 10 μl L-Laktat-Dehydrogenase-Lösung. Die Proben gut mischen, 30 min bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend **E2** messen.

5.2.4. Auswertung

$$\Delta E_{\text{L-Laktat}} = E2 - E1$$

$$\Delta E_{\text{Blindwert}} = E2 - E1$$

Die Absorption der gemessenen Standards wird in einem Diagramm gegen die Konzentration aufgetragen und die Standardgerade (Eichkurve) bestimmt. Die ermittelte Geradengleichung zur Berechnung der Laktatkonzentration verwenden und in mg/dl bzw. mmol/l umrechnen und bewerten.

Literatur

- Arbeitsanweisung L-Milchsäure Kit von R-Biopharm (Nr. 10139084035)
- <http://www.bloodbook.com/ranges.html>

6. Harnanalyse

6.1. Einführung

Die Harnanalyse spielt eine große Rolle bei der Diagnose von Stoffwechselerkrankungen. So ist beispielsweise die Früherkennung einer diabetischen Stoffwechsellage durch den relativ empfindlichen Glucosenachweis leicht möglich. Die Analyse kann mit halbquantitativen Teststreifen in kleineren Arztpraxen oder mit hochempfindlichen photometrischen oder chromatographischen Messmethoden in Untersuchungslaboratorien durchgeführt werden.

Die Zusammensetzung des Harns hängt von verschiedenen Faktoren (wie Geschlecht, Alter, Gewicht und Ernährungsform) ab und lässt sich über die Identifizierung und die Bestimmung der Konzentration von Bestandteilen als „normal“ oder „krankhaft“ einordnen.

Zusammen mit der Blutuntersuchung steht die Harnanalyse an erster Stelle bei den Routine- und Screening-Untersuchungen.

6.2. Aufgabe

In diesem Versuch wird die Zusammensetzung von 24h-Harn-Proben (jeder Student nimmt die eigene Harnprobe) untersucht. Parallel wird zur Qualitätskontrolle je Studentengruppe eine präparierte Probe mitanalysiert. Im Einzelnen werden folgende Teilversuche durchgeführt, um unterschiedliche Parameter zu einem Gesamtbild der Harnzusammensetzung zusammenfügen zu können:

- | | |
|--|--|
| 6.8. Bestimmung des pH-Wertes | 6.15. Quantitative Bestimmung von Fructose und Glucose |
| 6.9. Qualitativer Nachweis von Eiweiß | |
| 6.10. Qualitativer Nachweis von Blut | 6.16. Qualitativer Nachweis von Aceton |
| 6.11. Qualitativer Nachweis von Gesamtzucker | 6.17. Quantitative Bestimmung von Kreatinin |
| 6.12. Qualitativer Nachweis von Pentosen | 6.18. Quantitative Bestimmung von Harnsäure |
| 6.13. Qualitativer Nachweis von Fructose | 6.19. Quantitative Bestimmung von Harnstoff |
| 6.14. Halbquantitativer Nachweis von Glucose | |

6.3. Bericht und Zusammenfassung der Ergebnisse

Falls nicht anders angegeben, sollen Sie alle qualitativen sowie quantitativen Ergebnisse in tabellarischer Form zusammenfassen.

Interpretieren Sie diese Ergebnisse hinsichtlich auftretender Abweichungen vom Normbereich und bezüglich zugrundeliegender Ursachen.

6.4. Vorbereitung auf den Versuch

Folgende Themenkomplexe sollten Sie sich vor Versuchsbeginn in Erinnerung rufen bzw. erarbeiten:

- ✓ Zusammensetzung des Harns
- ✓ Ernährungsassoziierte Erkrankungen mit Auswirkungen auf die Harnzusammensetzung
- ✓ Berechnung des pH-Wertes
- ✓ Stöchiometrische Berechnungen zur Herstellung prozentiger und molarer Lösungen
- ✓ Strukturformeln, Reaktionsgleichungen
- ✓ Photometrie

Literaturvorschläge:

- Mortimer C. E., Müller U. „Das Basiswissen der Chemie“; Thieme (z.B. 2003⁸)
- Gekle M., Wischemeyer E., Gründer S., Petersen M., Schwab A., Markwardt F., Klöcker N., Baumann R. und Marti H. „Taschenlehrbuch Physiologie“; Thieme (2010).

6.5. Sicherheit

Während dieses Versuches arbeiten sie mit folgend aufgeführten Chemikalien, welche giftig, gesundheitsschädlich, umweltgefährlich bzw. leichtentzündlich sein können. Es sind alle Schutzmaßnahmen, wie das Tragen von Schutzkleidung, Handschuhen sowie Schutzbrille, einzuhalten. Anweisungen der Betreuer sind Folge zu leisten. Bei Kontakt mit bzw. Verschütten von Chemikalien sind Betreuer sofort zu informieren.

- | | | |
|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Ethanol
Leichtentzündlich
R: 11
S: (2)-7-16• Methanol
Giftig,
Leichtentzündlich
R:
11-23/24/25-39/23/24/25
S: (1/2)-7-16-36/37-45• Essigsäure, 100 % (CH₃COOH)
Ätzend
R: 10-35
S: (1/2)-23-26-45• Salzsäure 32 %ige (HCl)
Ätzend ≥ 25 %
R: 34-37
S: (1/2)-26-45• Natriumhydroxid (NaOH) – Lösung
Ätzend
R: 35
S: (1/2)-26-37/39-45 | <ul style="list-style-type: none">• Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂)
Ätzend, Brandfördernd
R: 5-8-20/22-35
S:
(1/2)-17-26-28-36/37/39-45• Orcin (Orcinol)
Gesundheitsschädlich
R: 22-36/37/38
S: 22-26-36• o-Tolidin
Giftig,
Gesundheitsschädlich,
Umweltgefährlich
R: 45-23/25-36-50
S: 53-45-61• Resorcin
Gesundheitsschädlich,
Umweltgefährlich
R: 22-36/38-50
S: (2)-26-61• Triethanolamin-Hydrochlorid | <ul style="list-style-type: none">((HOCH₂CH₂)₃N x HCl)
Reizend
R: 20/21/22-36/37/38
S: 26-36/37/39• Nicotinamidadeninnukleotidphosphat (NADP-Na₂)
Reizend
R: 36/37/38
S: 26-36• Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz (ATP-Na₂)
Reizend
R: 36/37/38
S: 22-24/25-36-26• Natriumcarbonat Decahydrat (Na₂CO₃ x 10 H₂O)
Reizend
R: 36
S: (2)-22-26 |
|--|---|--|

- | | | |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Kupfer (II)-sulfat Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$)
Gesundheitsschädlich,
Umweltgefährlich
R: 22-36/38-50/53
S: (2)-22-60-61 • Eisen (III)-chlorid (FeCl_3)
Gesundheitsschädlich
R: 22-38-41 | <p>S: 26-39</p> <ul style="list-style-type: none"> • I_2-Lösung
Gesundheitsschädlich,
Umweltgefährlich
R: 20/21-50
S: (2)-23-25-61 • Pikrinsäure
Explosionsgefährlich
(im festen Aggregatzustand),
Giftig
R: 3-4-23/24/25 | <p>S: (1/2)-28-35-36/37-45</p> <p>-Harnstoff Test-Kit (Urea CT FS)
Reizend,
Gesundheitsschädlich
R: 36/38-42
S: 2-23-24/25-26-37/39-45-6</p> |
|---|---|---|

6.6. Hinweise

Reagenzien

Alle Reagenzien sind, wenn nicht anders angegeben, bereits gebrauchsfertig und werden Ihnen vom Betreuer zur Verfügung gestellt.

Abfälle

Abfälle, die bei den einzelnen Versuchen anfallen, werden gesondert in den jeweiligen Abfallbehältern gesammelt.

Bei auftretenden Fragen bzw. Unsicherheiten zur Entsorgung kontaktieren sie ihren Betreuer.

Vorhandene Abfallsammelbehälter:

- Halogenfreie Lösungsmittel (z. B. Aceton, Ethanol, Methanol, gelöste halogenfreie organische Substanzen wie z. B. Benzidinreagenz)
- Halogenhaltige Lösungsmittel (z. B. Chloroform, gelöste halogenorganische Substanzen)
- Säuren (z. B. Salzsäure)
- Laugen (z. B. Natriumhydroxid-Lösung)
- Anorganische Flüssigabfälle (z. B. Kupfersulfat-Lösung)
- Biologischer Abfall / Harn – Flüssig
- Biologischer Abfall / Harn – Fest (z. B. Reaktionsgefäße, welche Harn enthielten)

6.7. 24 h-Harn-Sammlung

Für eine quantitative Bestimmung von Harnbestandteilen ist es notwendig, den Harn eines gesamten Tages zu sammeln. Dies geschieht im Rahmen einer 24 h-Harn-Sammlung. Hierfür wird die 1. Blasenentleerung des gesetzten 24 h-Zeitraumes (beispielsweise um 8:00 Uhr morgens) verworfen und alle darauffolgenden Blasenentleerungen im genannten Zeitraum gesammelt und dokumentiert. Zudem muss die letzte Entleerung am folgenden Tag um die gleiche Zeit wie am Vortag (wieder z. B. um 8:00 Uhr; also 24 h nach Beginn der Zeitmessung) gesammelt werden.

6.7.1. Verbrauchsmaterialien/Geräte

- 0,25 L Harnsammelgefäß
- 2,5 L Harnsammelgefäß
- Präzisionswaage
- 15 mL Kunststoff-Zentrifugenröhrchen
- Zentrifugenröhrchen-Ständer
- Messpipette (10 mL)
- Pipettierhilfe

Hinweis: Jeder Student erhält **3 Tage vor Beginn des Versuchs** ein kleines (0,25 L) und großes (2,5 L) Harnsammelgefäß für die Probensammlung.

Der Sammelurin sollte möglichst kühl (4 – 8 °C) und lichtgeschützt aufbewahrt werden.

6.7.2. Durchführung

Zunächst wird morgens die Blase in die Toilette entleert und die Uhrzeit notiert. Nun wird jeder Urin im Verlauf des Tages und der folgenden Nacht in das kleine Harn-Sammelgefäß (0,25 L) abgelassen und in das große Harn-Sammelgefäß (2,5 L) überführt. Am nächsten Morgen wird der Inhalt der Blase exakt 24 h nach Beginn der Zeitmessung in das Sammelgefäß entleert. Das gefüllte große Sammelgefäß (2,5 L) wird auf der Präzisionswaage gewogen. Nun wird der Inhalt durch Schütteln des Sammelgefäßes (2,5 L) gut durchmischt. Anschließend werden viermal jeweils 10 ml Harn in ein 15 mL Kunststoff-Zentrifugenröhrchen überführt. Der restliche Harn wird in die Toilette verworfen. Bestimmen Sie das Leergewicht des Sammelgefäßes und errechnen Sie so das Gewicht des 24 h-Harns. Das große Sammelgefäß wird sodann sofort desinfiziert: nach Einwirken des Desinfektionsmittels (nach 30 min bzw. zum Ende des Praktikums) wird dieses verworfen und das Gefäß abschließend gesäubert.

6.7.3. Auswertung

Berechnen Sie anhand der von Ihnen ermittelten Wägewerte das Gewicht und das Gesamtvolumen des 24 h-Harns. Die Dichte des Harns eines gesunden Menschen liegt dabei zwischen 1,015 und 1,025 g/mL. Diese Werte werden mit den folgenden Parametern verglichen:

Parameter:

- Harnausscheidung beim gesunden Menschen: i.d.R. 1 – 1,5 L/Tag; Schwankungen im Bereich 0,5 – 2 L/Tag; dabei beeinflussen die Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme ebenso wie die Flüssigkeitsverluste über Schweiß, Atmung und Stuhlgang die Menge des Urins.
- Wenn die ermittelte Menge an täglich ausgeschiedenem Urin von den Normalwerten abweicht, spricht man von Oligurie, Anurie oder Polyurie.
 - **Oligurie:** Ausscheidung von Urin weniger als 0,5 L/Tag (z.B. als Folge von Nierenstörungen)
 - **Anurie:** Ausscheidung von Urin weniger als 0,1 L/Tag
 - **Polyurie:** Ausscheidung von Urin über 2 L/Tag (z.B. bei Diabetes mellitus)

6.8. Bestimmung des pH-Wertes

6.8.1. Allgemeines

Der pH-Wert ist der negative dekadische Logarithmus des Zahlenwertes der Protonenaktivität ($\cong$ Protonenkonzentration). Der pH-Wert ist eine dimensionslose Größe und wird in dem Bereich von 0-14 angegeben.

Der pH-Wert des Urins eines gesunden Menschen liegt zwischen 4,8 und 7,4. Ein deutlich saurer pH-Wert des Harns deutet auf eiweißreiche Kost oder einen gesteigerten Eiweißzerfall, wie z. B. infolge maligner Prozesse, Fieber oder schwerer Diarrhoe, hin. Auch Azidosen (respiratorisch, metabolisch) können zu einer Senkung des pH-Wertes im Harn führen. Bei Harnwegsinfektionen oder respiratorischer bzw. metabolischer Alkalose kann der Harn hingegen einen alkalischen pH-Wert aufweisen.

Hinweis: Bakterielle Zersetzung verschiebt den pH-Wert ebenfalls in den alkalischen Bereich. Daher ist die Analyse von frischem Harn vorzunehmen.

6.8.2. Prinzip der Methode

Die pH-Wert-Messung erfolgt mittels einer Einstabelektrode (pH-Elektrode), welche eine Glaselektrode sowie eine Bezugselektrode enthält. Die Ausbildung eines elektrischen Potentials an der Glasmembran ist abhängig von der Protonenkonzentration. Aus der Potentialdifferenz zur Bezugselektrode entsteht eine Spannung, welche den pH-Wert darstellt.

6.8.3. Durchführung

Probe

5 mL 24 h-Harn

Verbrauchsmaterialien/Geräte

- | | |
|-----------------------|----------------------|
| - pH-Meter | - Reagenzglasständer |
| - Glaselektrode | - Messpipette (5 mL) |
| - Reagenzglas (15 mL) | - Pipettierhilfe |

Durchführung

Es werden 5 mL 24 h-Harn mit Hilfe einer Messpipette in ein Reagenzglas (15 mL) pipettiert. Nun wird mit der Glaselektrode des pH-Meters der pH-Wert des Harns auf 0,1 pH-Einheiten genau ermittelt. Der Harn wird nicht verworfen, sondern für den nächsten Versuch (Eiweißnachweis) aufbewahrt und verwendet.

6.8.4. Auswertung

Bestimmen und kommentieren Sie den pH-Wert des von Ihnen untersuchten Harns.

6.9. Qualitativer Nachweis von Eiweiß

6.9.1. Allgemeines

Manche Nierenerkrankungen lassen sich anhand erhöhter Eiweißausscheidung (Proteinurie) im Urin feststellen, da die Filterfunktion der Nieren gestört ist und Eiweiße vom Blut in den Urin gelangen. Eine Menge von weniger als 150 mg Eiweiß/24 h (entsprechend einer Eiweißkonzentration im Urin von <150 mg/L bei normaler Harnausscheidung) gilt als normal.

6.9.2. Prinzip der Methode

Die Biuret-Methode ist eine Methode zur Proteinbestimmung und beruht darauf, dass Verbindungen mit mindestens zwei Peptidbindungen in wässriger alkalischer Lösung einen Komplex mit zweiwertigen Kupferionen eingehen. Dabei resultiert ein Farbumschlag ins Violette. Komplexbildung erfolgt über die freien Elektronenpaare des Peptidbindungsstickstoffs.

Im Vergleich zu anderen Methoden ist die Biuret-Methode zwar unempfindlich (etwa 1000-fach höhere Eiweißmengen als mit empfindlicheren Methoden sind für einen nachweisbaren Farbumschlag nötig), jedoch ist sie schnell, günstig und einfach durchzuführen.

6.9.3. Durchführung

Probe

- 1 mL 24 h-Harn
- Zwei Standardlösungen mit bekannten Proteinkonzentrationen (Angaben hierzu im Praktikum)

Chemikalien

- 3% (w/v) NaOH in Wasser („3%-ige Natronlauge“):
3 g Natriumhydroxid werden im 100 mL-Maßkolben in Wasser gelöst und auf ein Gesamtvolumen von 100 mL aufgefüllt
ACHTUNG – ätzend!
- 7% (w/v) CuSO₄ in Wasser
1,75 g Kupfer(II)sulfat werden im 25 mL-Maßkolben in Wasser gelöst und auf ein Gesamtvolumen von 25 mL aufgefüllt

Verbrauchsmaterialien/Geräte

- | | |
|--|--------------------------------------|
| - Zentrifugenröhrchen-Ständer | - Mikropipette (200 µl, 1000 µl) und |
| - 15 mL Kunststoff-Zentrifugenröhrchen | Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl) |
| - Messpipette (1 mL, 5 ml) | - Vortexer |
| - Pipettierhilfe | - Schutzbrille |

Durchführung

1 mL Harn (aus der pH-Wert-Ermittlung) werden in ein 15 mL Kunststoff-Zentrifugenröhrchen pipettiert, mit 5 mL 3% Natronlauge versetzt und durch Vortexen gut gemischt. Nun werden 175 µL 7% Kupfersulfatlösung hinzupipettiert und wieder kräftig gemischt.

Auf dieselbe Art werden zwei Ihnen zur Verfügung gestellte Lösungen mit bekannten Proteinkonzentrationen behandelt.

6.9.4. Auswertung

Nach Mischen kommt es zum Farbumschlag, der je nach Proteinkonzentration von hellblau (kein Protein) über schwach violett (leicht positiv) bis tiefviolett (stark positiv) reichen kann.

Mit Hilfe der Farbumschläge der beiden Lösungen mit bekanntem Proteingehalt sollen Sie nun die Proteinkonzentration Ihrer Probe abschätzen (Frage: Wie müssten Sie vorgehen, um aus dieser qualitativen eine quantitative Protein-bestimmung zu machen?).

Sodann sollen Sie mit Hilfe des von Ihnen bestimmten Gesamtvolumens an Harn Rückschlüsse auf die Eiweißausscheidung ziehen.

6.10. Qualitativer Nachweis von Blut

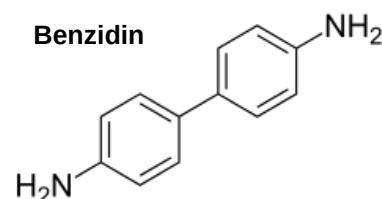
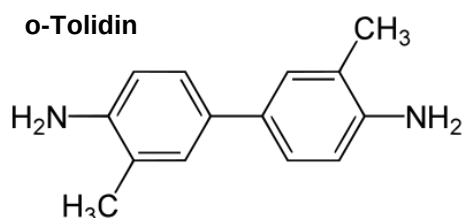
6.10.1. Allgemeines

Untersuchungen hinsichtlich des Blutgehaltes im Urin stellen eine wichtige Diagnose in Bezug auf Erkrankungen bzw. Verletzungen des Nierenbereiches, der Nieren oder der Harnwege dar.

Große Mengen Blut im Urin (Makrohämaturie) lassen sich schon an der Farbe des Harns, von sichtbar hell- bis dunkelrot, erkennen. Ein geringes Vorhandensein von roten Blutkörperchen, welche nur mikroskopisch bzw. mittels Teststreifen zu analysieren sind, wird als Mikrohämaturie bezeichnet.

6.10.2. Prinzip der Methode

Der Nachweis von Blutspuren basiert auf der Eigenschaft von Häm (beispielsweise im Hämoglobin oder in verschiedenen Peroxidaseenzymen), die Oxidation von Testsubstanzen durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu katalysieren. Die Oxidationsprodukte der eingesetzten Testsubstanzen haben nun entweder eine Eigenfärbung (wie im vorliegenden Test) oder werden unter Lichtfreisetzung gebildet (wie im Falle der in jedem forensisch eingesetzter Blutnachweismethoden). Ein klassischer Nachweis von Blutspuren in Urin, Faeces etc. ist der Benzidin-Test. Hierbei wird Benzidin in Gegenwart von Hämproteinen durch Wasserstoffperoxid zu einem Farbstoff oxidiert. Aufgrund der Karzinogenität des Benzidins werden inzwischen andere Testsubstanzen eingesetzt, wie etwa das Tetramethylbenzidin oder das hier verwendete o-Tolidin (Dimethylbenzidin).



6.10.3. Durchführung

Probe

3 mL 24 h-Harn

Chemikalien/Reagenzien (werden alle bereitgestellt)

- | | |
|---------------------------------|----------------------------------|
| - o-Tolidin | - 3%ige Wasserstoffperoxidlösung |
| - Methanol | - 50%ige Essigsäure-Lösung |
| - 100%ige Essigsäure (Eisessig) | |

Tolidinreagenz:

Wird aus zwei Lösungen hergestellt, die vor Gebrauch zu gleichen Teilen gemischt werden (pro Gruppe jeweils 5 ml Lösung 1 und 2)

Lösung 1: 1 g o-Tolidin in einem 100 mL Maßkolben in Methanol lösen und auffüllen (1%ig)

Lösung 2: Eisessig /3 %ige Wasserstoffperoxidlösung;
100 mL (1 Volumenanteil) 100 %ige Essigsäure und
200 mL (2 Volumenanteile) 3 %ige Wasserstoffperoxidlösung

Verbrauchsmaterialien/Geräte

- | | |
|--|-----------------------------|
| - Zentrifugenröhrchen-Ständer | - Mikropipette (1000 µl) |
| - 15 mL Kunststoff-Zentrifugenröhrchen | - Pipettenspitzen (1000 µl) |
| - Messpipetten (5 mL) | - Vortexer |
| - Pipettierhilfe | |

Durchführung

Es werden 3 mL Harn sowie 250 µL 50 %ige Essigsäure in ein 15 mL Kunststoff-Zentrifugenröhrchen pipettiert und anschließend gut durchmischt (Vortexer). Nun erfolgt die Zugabe von 3 mL Tolidinreagenz und erneuter Durchmischung. Zum Schluss werden 200 µL 3%iges H₂O₂ zum vorhandenen Harn-Tolidinreagenz-Gemisch hinzugegeben und wieder gemischt.

6.10.4. Auswertung

Beim Vorhandensein von Blut entsteht eine blaue Färbung (von blauviolett bis blaugrün). Sollte eine geringe Blutmenge vorhanden sein tritt die Färbung erst nach 5 -10 min auf.

Normwerte für Blut im Harn beim gesunden Menschen

Erythrozyten: < 5x10³ Zellen/ mL

Leukozyten: < 10⁴ Zellen/ mL

6.11. Qualitativer Nachweis von Gesamtzucker

6.11.1. Allgemeines

Nach der Aufnahme kohlenhydrathaltiger Kost liegen die Kohlenhydrate nach Hydrolyse im Verdauungstrakt vorwiegend als Monosaccharide vor.

Eine erhöhte Menge an reduzierenden Zuckern im Harn, wie Fructose und Glucose, kann unterschiedliche physiologische Ursachen haben (vgl. 6.1 und 7.1).

Der folgende Versuch stellt ein „Vor-Screening“ dar, an welches sich bei positivem Ergebnis die Versuche 6, 7, 8 anschließen.

6.11.2. Prinzip der Methode

Die Reaktion nach BENEDICT dient zum Nachweis reduzierender Zucker. Die Kupfer(II)-Ionen oxidieren reduzierende Zucker, wobei sich Kupfer(I)oxid und Kupfer(I)hydroxid sowie die entsprechenden Zucker-Oxidationsprodukte bilden. Cu_2O und CuOH erscheinen je nach Zuckerkonzentration grün bis rotbraun.

6.11.3. Durchführung

Probe

3 mL 24 h-Harn

Chemikalien

- Natriumcitrat-Dihydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)
- Natriumcarbonat-Decahydrat ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$)
- Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$)
- Benedicts Reagenz: Lösung 1 (4,25 mL) mit Lösung 2 (0,75 mL) langsam vermischen
(direkt vor Gebrauch anzusetzen pro Gruppe)

Lösung 1: 0,788 M Natriumcitrat
1 M Natriumcarbonat
in H_2O
(beide Salze durch erwärmen zum Lösen bringen sowie filtrieren)

Lösung 2: 0,462 M Kupfer(II)-sulfat in H_2O

Verbrauchsmaterialien/Geräte

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| - Bunsenbrenner | - Reagenzglasständer |
| - Feuerzeug | - Messpipetten (5 mL) |
| - Reagenzglas (15 mL) | - Pipettierhilfe |
| - Reagenzglashalter | - Vortexer |

Durchführung

Es werden 3 mL Harn in ein Reagenzglas vorgelegt, mit 1,5 mL Benedicts Reagenz versetzt und durch Vortexen gemischt. Nun wird das Gemisch vorsichtig mit Hilfe des Bunsenbrenners bis zum Sieden erhitzt. Achtung: das befüllte Reagenzglas nicht länger als 15 sec in die Flamme halten, da es sonst zum Siedeverzug kommen kann (Spritzgefahr!). Stattdessen immer nur kurz durch die Brennerflamme ziehen und auf das Sieden achten (vgl. aufsteigende Bläschen im Reagenzglas). Anschließend wird das erhitzte Gemisch unter fließendem Leitungswasser abgekühlt.

6.11.4. Auswertung

Bei Anwesenheit von Zucker fällt nun gelboranges bis rotbraunes Kupfer(I)oxid aus. Je nach Konzentration tritt eine Farbnuancierung von grün bis rot auf. Somit ist eine Abschätzung des Zuckergehaltes schon optisch möglich.

6.12. Qualitativer Nachweis von Pentosen

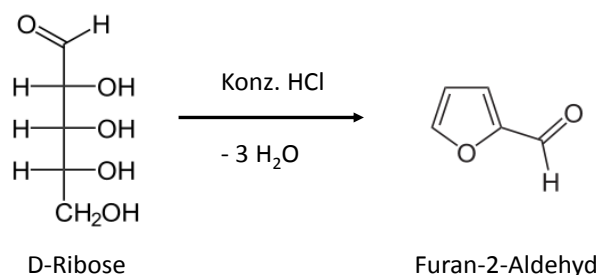
6.12.1. Allgemeines

Der Nachweis von Pentosen im Harn kann auf einige seltene Stoffwechselerkrankungen, wie z. B. Pentosurie hinweisen.

6.12.2. Prinzip der Methode

Probe nach Bial

Pentosen gehen unter Einwirkung von konzentrierter Salzsäure unter Wasseraustritt in Furfural (Furan-2-aldehyd) über, das sich mit Orcinol (3,5-Dihydroxytoluol) smaragdgrün färbt.



6.12.3. Durchführung

Probe

400 µL 24 h-Harn

Chemikalien

- 32 %ige Salzsäure (HCl)
- Orcinol
- Eisen (III)-chlorid (FeCl_3)
- **10 %ige FeCl_3 -Lösung:**
10 g FeCl_3 in einem 100 mL Maßkolben in Wasser lösen und auffüllen.
- **Reagenz-Lösung:**
0,5 g Orcinol werden in 250 mL 32 %iger HCl gelöst. Zu dieser Lösung werden ca. 300 μL der 10 %igen FeCl_3 -Lösung gegeben. Lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren!

Verbrauchsmaterialien/Geräte

- | | |
|-----------------------|---|
| - Bunsenbrenner | - Pipettierhilfe |
| - Feuerzeug | - Mikropipette (1000 μL) |
| - Reagenzglas (15 mL) | - Pipettenspitzen (1000 μL) |
| - Reagenzglashalter | - Vortexer |
| - Reagenzglasständer | - Schutzbrille |
| - Messpipetten (5 mL) | |

Durchführung

Es werden 5 mL Reagenz-Lösung in ein Reagenzglas mit Hilfe einer Messpipette vorgelegt und mittels Vortexen gemischt. Nun wird die Reagenz-Lösung vorsichtig mit Hilfe des Bunsenbrenners bis zum Sieden erhitzt. Achtung: das befüllte Reagenzglas nicht länger als 15 sec in die Flamme halten, sonst kommt es zum Siedeverzug (Spritzgefahr!). Stattdessen immer nur kurz durch die Brennerflamme ziehen und auf das Sieden achten (vgl. aufsteigende Bläschen im Reagenzglas). Die heiße Reagenz-Lösung wird nun mit 400 μL Harn überschichtet und für 10 min stehengelassen.

6.12.4. Auswertung

Bei Anwesenheit von Pentosen färbt sich die Grenzschicht zwischen Harn und Reagenz smaragdgrün.

6.13. Qualitativer Nachweis von Fructose

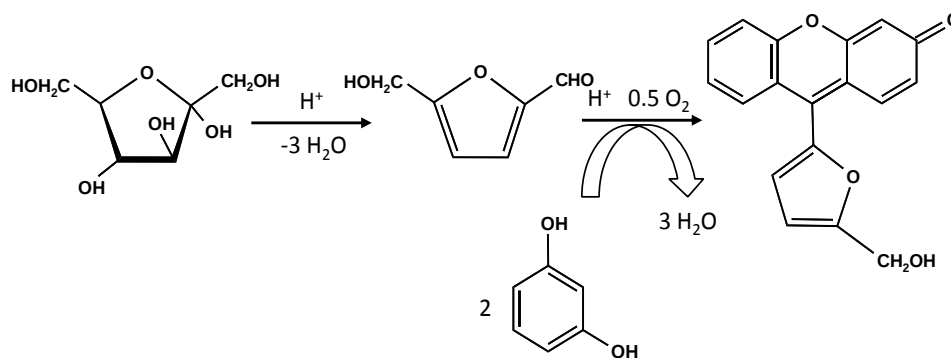
6.13.1. Allgemeines

Ein erhöhter Fructosegehalt im Urin (Fructosurie) kann z. B. durch verschiedene Enzymdefekte wie Fructokinasmangel aber auch durch schwere Leberschäden hervorgerufen werden.

6.13.2. Prinzip der Methode

Probe nach Seliwanov

Fructose bildet beim Erhitzen mit konzentrierter Salzsäure Hydroxymethylfurfural, welches mit Resorcin eine Rotfärbung ergibt.



„Seliwanov-Probe“ oder Resorcin-Probe

6.13.3. Durchführung

Probe

1 mL 24 h-Harn

Chemikalien

- Resorcin
- 20 %ige Salzsäure (HCl)
- **Reagenz-Lösung:**

0,5 g Resorcin werden in einem 100 mL Maßkolben in 20 %iger HCl gelöst und aufgefüllt.

Verbrauchsmaterialien/Geräte

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| - Bunsenbrenner | - Messpipetten (1 mL) |
| - Feuerzeug | - Pipettierhilfe |
| - Reagenzglas (15 mL) | - Vortexer |
| - Reagenzglashalter | - Schutzbrille |
| - Reagenzglasständer | |

Durchführung

In ein Reagenzglas wird 1 mL Harn mit Hilfe einer Messpipette vorgelegt, mit 1 mL Reagenz-Lösung versetzt und mittels Vortexen gemischt. Nun wird das Gemisch vorsichtig mit Hilfe des Bunsenbrenners zum Sieden erhitzt. Achtung: das befüllte Reagenzglas nicht länger als 15 s in die Flamme halten, sonst kommt es zum Siedeverzug (Spritzgefahr!). Stattdessen immer nur kurz durch die Brennerflamme ziehen und auf das Sieden achten (vgl. aufsteigende Bläschen im Reagenzglas).

6.13.4. Auswertung

Bei Anwesenheit von Fructose verfärbt sich die Flüssigkeit karminrot.

6.14. Halbquantitativer Nachweis von Glucose

6.14.1. Allgemeines

Bei einer Glukosurie können die Glucosegehalte im Urin z. B. infolge Diabetes mellitus oder einer Schädigung des Tubulusapparates erhöht sein. Normalerweise werden im Harn nur sehr geringe Mengen von ca. 70 mg Glucose innerhalb 24 h ausgeschieden. Bei kohlenhydratreicher Kost kann dieser Wert bei einem gesunden Menschen auch auf 200 mg / 24 h ansteigen.

6.14.2. Prinzip der Methode

Ein spezifischer Glucose-Nachweis lässt sich mit Hilfe von Glucose-Teststreifen durchführen. Das Testfeld enthält Glucoseoxidase, die die Oxidation von Glucose zu Gluconolacton unter Bildung von Wasserstoffperoxid katalysiert. Analog zur Messung von Harnsäure (vgl. 11.) enthält der Teststreifen zudem eine Peroxidase (Frage: wozu?).

6.14.3. Durchführung

Probe

Ca. 1 mL 24 h-Harn

Verbrauchsmaterialien/Geräte

- | | | |
|---------------------------|----------------------|------------|
| - Pasteurpipette | - Glucose-Testpapier | (inklusive |
| - Reaktionsgefäß (1,5 mL) | Farbskala) | |
| - Reaktionsgefäßständer | | |

Durchführung

In ein 1,5 mL Reaktionsgefäß werden 1 mL Harn pipettiert. Nun wird das 5 mm breite Ende des Teststreifens unterhalb der Indikatorzone durch kurzes Eintauchen mit Urin benetzt. Der Urin dringt nun von selbst in die gelbe Reaktionszone ein. Die Farbänderung des Indikatorpapiers muss innerhalb von 2 min mit der Farbskala verglichen werden. Dabei handelt es sich um eine halbquantitative Abschätzung des Glucose-Gehaltes.

6.14.4. Auswertung

Die Farbskala gibt folgende halbquantitative Abschätzungen des Glucosegehalts an

Farbe	Glucose	Konzentration
gelb	negativ	-
hellgrün	gering positiv	20 mg/dL
türkisgrün	positiv	50 mg/dL
grün	hoch positiv	200 mg/dL
dunkelgrün	stark positiv	2000 mg/dL

6.15. Quantitative Bestimmung von Glucose und Fructose

6.15.1. Allgemeines

Fallen die qualitativen Nachweise von Glucose bzw. Fructose positiv aus, wird eine quantitative Bestimmung angeschlossen.

6.15.2. Prinzip der Methode

Glucoseweg

- | | | |
|-----|--|--------------------------|
| (1) | $\text{Glucose} + \text{ATP} \rightarrow \text{G6P (Glucose-6-phosphat)} + \text{ADP}$ | Enzym: Hexokinase |
| (2) | $\text{G6P} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{6-Phosphogluconat} + \text{NADPH/H}^+$ | Enzym: G6P-Dehydrogenase |

Fructoseweg

- | | | |
|------|--|--------------------------------|
| (1') | $\text{Fructose} + \text{ATP} \rightarrow \text{F6P (Fructose-6-phosphat)} + \text{ADP}$ | Enzym: Hexokinase |
| (2') | $\text{F6P} \rightarrow \text{G6P}$ | Enzym: Phosphoglucoseisomerase |
| (3') | $\text{G6P} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{6-Phosphogluconat} + \text{NADPH/H}^+$ | Enzym: G6P-Dehydrogenase |

Die NADPH-Bildung ist der Glucose- bzw. Fructose-Konzentration äquivalent. NADPH ist die Messgröße und wird photometrisch bei 340 nm bestimmt.

6.15.3. Durchführung

Probe

1 mL 24 h-Harn

Chemikalien

- | | |
|--|---|
| - Triethanolamin-Hydrochlorid
((HOCH ₂ CH ₂) ₃ N x HCl) | - Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) |
| - Natriumhydroxid (NaOH) | - NADP-Na ₂ |
| - Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ x 7H ₂ O) | - ATP |
| - Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) | - Hexokinase/Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (HK/G6P-DH) |
| - 1 M NaOH:
15 g NaOH werden in einem 100 mL Maßkolben in Wasser auf Eis gelöst und bei RT aufgefüllt | - Phosphoglucose-Isomerase (PGI) |
| - 10 mM KH ₂ PO ₄ pH 8,0: Puffer dient als Stabilisator für Enzymstammlösungen HK/G6P-DH und PGI | |
| - Puffer-Lösung:
7,0 g Triethanolamin-Hydrochlorid und 0,125 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat werden in 40 mL dest. Wasser gelöst, mit ca. 3 mL 1M Natronlauge auf pH 7,6 eingestellt und in einem 50 mL Maßkolben mit Wasser aufgefüllt. | |

- **NADP-Lösung:** Täglich frisch herzustellen!
30 mg NADP- Na₂ werden in 3 mL dest. Wasser gelöst.
- **ATP-Lösung:** Täglich frisch herzustellen!
150 mg ATP und 150 mg Natriumhydrogencarbonat werden in 3 mL dest. Wasser gelöst.
- **HK/G6P-DH:** Lagerung bei 4°C
1,7 Units/ml / 0,9 Units/ml in 10 mM KH₂PO₄ pH 8,0
- **PGI:** Lagerung bei 4°C
4,3 Units/ml in H₂O bzw. 10 mM KH₂PO₄ pH 8,0

Verbrauchsmaterialien/Geräte

- Photometer mit Küvettenport
- Makro-Einmalküvetten (Volumen: 4 mL;
1 cm Schichtdicke)
- Küvettenständer
- Plastik-Rührspatel
- Mikropipetten (100, 1000 µL)
- Pipettenspitzen (100, 1000 µL)
- Timer

Durchführung

Pro Küvette werden die Puffer/Lösungen/Enzyme wie nachfolgend pipettiert:

Puffer/Lösung/Enzym	Blindwert (µL)	Probe (µL)
Puffer-Lösung	1000	1000
NADP-Lösung	100	100
ATP-Lösung	100	100
Harn	-	100
H ₂ O	2000	1900
Die Reagenzien des Blindwerts bzw. der Probe direkt in der Küvette mit einem Plastik-Rührspatel vermischen. Es erfolgt eine Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Extinktion (E ₁) bei 340 nm gemessen.		
<i>Start der 1. Reaktion durch Zugabe der Enzymmischung HK/G6P-DH</i>		
HK/G6P-DH (1,7 U/mL)	20	20
Die Reagenzien wieder mit einem Plastik-Rührspatel vermischen und 15 min bei Raumtemperatur inkubieren. Nach Ablauf der Zeit wird wieder die Extinktion (E ₂) der Lösungen bei 340 nm gemessen. Falls die Reaktion nach 15 min nicht zum Stillstand gekommen ist, Extinktionen weiter in 5 min-Abständen messen, bis eine konstante Extinktionszunahme pro 5 min erreicht ist.		
<i>Start der 2. Reaktion durch Zugabe des Enzyms PGI</i>		
PGI (4,3 U/mL)	20	20
Die Reagenzien wieder mit einem Plastik-Rührspatel vermischen und 15 min bei Raumtemperatur inkubieren. Nach Ablauf der Zeit wird wieder die Extinktion (E ₃) der Lösungen bei 340 nm gemessen.		

Hinweis: Wurden bei E_2 konstante Extinktionszunahmen festgestellt, werden die Extinktionen auf die Zeit der Zugabe von HK/G6P-DH extrapoliert.

6.15.4. Auswertung

Berechnen Sie die Glucose- und Fructose-Konzentration Ihres 24 h-Harns mittels folgender Gleichungen:

Für Glucose:

$$E_{\text{Glc}} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Blindwert}}$$

$$c [\text{mM}] = (32,2 \times E_{\text{Glc}}) / 6,3$$

$$c [\text{g/L}] = (5,801 \times E_{\text{Glc}}) / 6,3$$

Für Fructose:

$$E_{\text{Fru}} = (E_3 - E_2)_{\text{Probe}} - (E_3 - E_2)_{\text{Blindwert}}$$

$$c [\text{mM}] = (32,4 \times E_{\text{Fru}}) / 6,3$$

$$c [\text{g/L}] = (5,837 \times E_{\text{Fru}}) / 6,3$$

Frage: Wie kommen die Faktoren in diesen Gleichungen zustande?

Hinweis 1: Der molare Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm (ϵ_{340}) ist $6,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

Hinweis 2: Die molare Masse von Glucose und Fructose ist 180,16 g.

6.16. Aceton

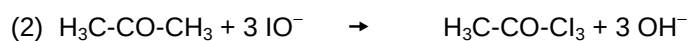
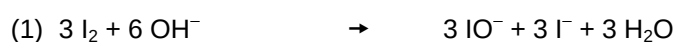
6.16.1. Allgemeines

Durch Nahrungsmangel bzw. Nährstoffmangel aktiviert der Organismus katabole Stoffwechselwege, um wichtige Körperfunktionen aufrecht zu erhalten. So werden nacheinander zur Deckung des Energiebedarfs Energievorräte in Form von Kohlenhydraten (z. B. Glykogen), Fetten (z. B. subkutanen Fettgewebe) und letztlich auch Proteinen (z. B. Muskulatur) angegriffen. Der Fettstoffwechsel wird auf den Abbau von Fettsäuren durch β -Oxidation und die Synthese von Ketonkörpern (Ketogenese) umgestellt, die ihm ähnlich wie Blutzucker als Energielieferanten dienen. Normalerweise sind Ketone wie Aceton nicht im Harn nachzuweisen. Weist der folgende Test Ketone nach, so ist dies ein Hinweis auf Hungerzustände oder Diabetes mellitus – die sogenannte Ketonurie. Eine frühzeitige Erkennung verhindert eine Entgleisung des Stoffwechsels.

6.16.2. Prinzip der Methode

Acetonnachweis nach Lieben (Iodoform-/Haloformreaktion)

Bei Anwesenheit von Aceton ($\text{H}_3\text{C-CO-CH}_3$) entsteht durch Zugabe von Iod im alkalischen Milieu gelbliches Iodoform (CHI_3) mit dem typischen Iod-Geruch.



6.16.3. Durchführung

Probe

5 mL 24 h-Harn

Chemikalien

- **3,75 M NaOH:**
15 g NaOH werden in einem 100 mL Maßkolben in dest. Wasser auf Eis gelöst und aufgefüllt.
- 0,1 N I₂-Lösung Lichtgeschützt aufbewahren!

Verbrauchsmaterialien/Geräte

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------|
| - 15 ml Zentrifugenröhrchen | - Pipettierhilfe |
| - Reagenzglas (15 mL) | - Trichter |
| - Reagenzglasständer | - Filterpapier |
| - Messpipette (2 mL, 5 mL) | - Styroporbox gefüllt mit Eis |

Durchführung

Es werden 5 mL 24 h-Harn in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen vorgelegt, mit 2,5 mL 3,75 M NaOH-Lösung versetzt und mittels Vortexen homogenisiert. Das Gemisch wird langsam in ein Reagenzglas filtriert. 2 mL des Harn-NaOH-Gemisches werden entnommen, in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt, mit 2 mL 0,1 N I₂-Lösung versetzt und erneut gemischt. Den Ansatz sofort auf Eis abkühlen lassen.

6.16.4. Auswertung

Sollte Aceton enthalten sein, entsteht eine gelblich-weiße Fällung (als Schleier sichtbar) sowie ein stechender Iodoformgeruch. Bei einem geringen Acetongehalt entsteht nur eine Trübung.

6.17. Kreatinin

6.17.1. Allgemeines

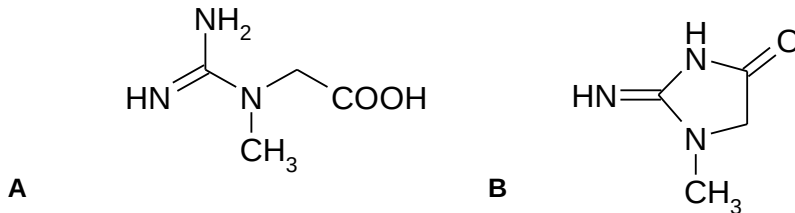
Die Harntagesausscheidung unterliegt mehr oder weniger großen Schwankungen, weshalb bei stoffwechselphysiologischen Untersuchungen mit dem Kreatiningehalt des Harns eine Bezugsgröße zur Verfügung steht, die ziemlich konstante (wenn auch individuell leicht unterschiedliche) Werte hat (1–2 g pro 24 h) und unabhängig von der Harnmenge/24 h ist. Diese Werte hängen von Faktoren wie Muskelmasse und Alter ab.

Kreatin und Kreatinin

Wie den untenstehenden Strukturen zu entnehmen ist, kann Kreatinin durch einfache Zyklisierung des Kreatins unter Ausbildung einer intramolekularen Peptidbindung (eines Lactams) entstehen. Diese Reaktion erfolgt, auch im Körper, nichtenzymatisch und führt zum Verlust von knapp 2% des Gesamtkreatins täglich. Da dabei Wasser abgespalten wird, bezeichnet man Kreatinin auch als ein

Anhydrid des Kreatins.

Kreatin ist N-Methylguanidino-Essigsäure und spielt eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel, indem es in Form von Phosphokreatin (also als Träger eines Phosphatrestes; das Phosphat ist hierbei an die Aminofunktion der Guanidinogruppe gebunden) sehr schnell zur Phosphorylierung von ADP zu ATP herangezogen werden kann. Etwa 98% des Gesamtkreatins befinden sich in Muskelgewebe.

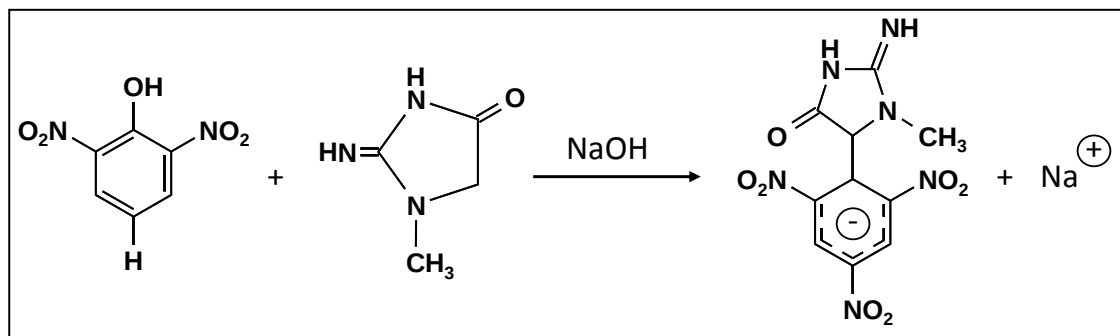


Strukturen von Kreatin (A) und Kreatinin (B)

Das Kreatinin ist somit das Abbauprodukt des Kreatins; es wird im Harn ausgeschieden.

6.17.2. Prinzip der Methode

Jaffé-Reaktion – Kreatinin bildet mit Pikrinsäure in alkalischer Lösung einen sogenannten Meisenheimer-Komplex mit orangeroter Färbung, der bei 510 nm photometrisch gemessen und somit quantifiziert werden kann.



Jaffé-Reaktion

6.17.3. Durchführung

Probe

1 mL 24 h-Harn

Chemikalien

- 0,35 mM Pikrinsäure
- 1,6 M Natriumhydroxid-Lösung (ACHTUNG – ÄTZEND!)
- Dest. Wasser
- **Kreatinin-Lösungen**

Kreatinin-Stammlösung (SS), 200 mg/100 mL Wasser

Kreatinin-Arbeitslösung (AL), 100 µL Kreatinin-Stammlösung/10 mL Wasser

- **Reaktionsgemisch:**

2 mL 0,35 mM Pikrinsäure werden mit 2 mL 1,6 M NaOH-Lösung gemischt.

Verbrauchsmaterialien/Geräte

- 100-1000 µL Pipette
- 2,0 mL Reagiergefäße
- Halbmikro-Küvetten (d=10 mm)
- Vortexer
- 10, 100 mL Maßkolben
- Spektralphotometer

Durchführung

Hinweis: Der Harn ist vor der Analyse 1:50 mit destilliertem Wasser zu verdünnen.

Nachfolgende Reagenzien werden in den angegebenen Mengen (s. Pipettierschema) in 2 mL Reagiergefäße pipettiert, gründlich über Vortexen durchmischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Blindwert-, Proben- sowie Standard-Ansätze nach nochmaligem Durchmischen in Halbmikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm transferiert und die Absorption bei 510 nm gegen den Reagenzienblindwert gemessen.

Reagenz	Blindwert	Standard	Probe
Dest. Wasser	0,5 mL	-	-
Kreatinin-AL	-	0,5 mL	-
Verd. Harn	-	-	0,5 mL
Reaktionsgemisch	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

6.17.4. Auswertung

$$[Kreatinin]_{Probe} = \frac{E_{P^*}}{E_{Std^*}} \cdot [Kreatinin]_{Standard} \cdot VF$$

E_{P^*} Extinktion der Probe abzüglich Extinktion Blindwert

E_{Std^*} Extinktion des Standards abzüglich Extinktion Blindwert

VF Verdünnungsfaktor

Berechnen Sie anhand der von Ihnen ermittelten Werte den Gehalt an Kreatinin in mg/L bezogen auf das 24 h Gesamtvolumen. Um die Kreatinin-Tagesmenge pro Kilogramm Körpergewicht zu erhalten, wird dieser Wert durch das Körpergewicht (KG) des Probanden dividiert und mit den folgenden Normalbereichen verglichen:

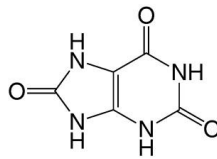
Frauen 7 – 21 mg/kg KG

Männer 9 – 25 mg/kg KG

6.18. Quantitative Bestimmung von Harnsäure

6.18.1. Allgemeines

Harnsäure und ihre Salze entstehen als Abbauprodukte der Purinnukleotide (v.a. Adenin, Guanin, Hypoxanthin enthaltende Nukleotide wie AMP, GMP, IMP), also auch im Katabolismus von Nukleinsäuren. Eine Haupt-Purinquelle in der Nahrung ist Fleisch. Bei einer purinarmen Diät scheiden Erwachsene 0,2 – 0,6 g und bei einer purinreichen Nahrung bis zu 2 g Harnsäure pro Tag aus. Die Harnsäure wird in der Niere zwar glomerulär filtriert, jedoch im Tubulus wieder nahezu vollständig rückresorbiert. Die Ausscheidung erfolgt dann in einem späteren Teil des Tubulus-Systems durch Sekretion in den Urin.



Harnsäure

Werden die Abbauprodukte der Purinnukleotide nicht zur Neusynthese von Nukleotiden und Nukleinsäuren verwendet, steigt die Plasmakonzentration der Harnsäure an. Das kann zur Hyperurikämie führen (von der man ab einer Konzentration von ca. 390 μM Harnsäure spricht) und in schwereren Fällen gar zur Präzipitation und Ablagerung von Kristallen aus Natriumurat und Harnsäure in Gelenken oder Nieren. Eine solche Ablagerung würde dort Entzündungsreaktionen initiieren, wie sie bei einer Gicht vorkommen. Zu einer erhöhten Harnsäure-Konzentration im Blut können sowohl eine erhöhte Bildung im Stoffwechsel als auch eine verminderte Ausscheidung beitragen. Beispiele hierfür sind Nierenerkrankungen mit verminderter Ausscheidung von Abfallprodukten, bestimmte Medikamente, Drogenmissbrauch und auch erhöhter Alkoholkonsum.

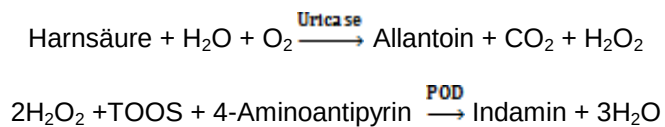
Harnsäurekristalle in den Nieren führen zu einer sogenannten Gichtnephropathie mit Entzündungen, Nierensteinen und zunehmend eingeschränkter Nierenfunktion, was mit einer erhöhten Harnsäureausscheidung im Urin einhergeht.

Die Behandlung dieser Erkrankungen erfolgt meist mit einer diätetischen und medikamentösen Dauertherapie, was unter anderem das Meiden von Innereien und Einschränken des Alkoholkonsums und auch die Einnahme von Präparaten, die die Harnsäureproduktion hemmen, umfasst.

Neben der Hyperurikämie gibt es auch das Krankheitsbild der Hypourikämie, welche ebenfalls vor allem mit Störungen des Purinstoffwechsels assoziiert ist. Diese entsteht durch eine verminderte Harnsäuresynthese (z.B. bei der Xanthinurie) oder durch eine erhöhte renale Harnsäureausscheidung. Im Fall der Xanthinurie wird aufgrund eines Mangels an Xanthinoxidase vermehrt Xanthin und weniger Harnsäure mit dem Urin ausgeschieden.

6.18.2. Prinzip der Methode

Das Enzym Uricase (auch als Uratoxidase bekannt) katalysiert die Oxidation der Harnsäure zu Allantoin in Gegenwart von Luftsauerstoff. Dabei wird Wasserstoffperoxid gebildet, das in einer zweiten (gekoppelten und von einer Peroxidase katalysierten) Reaktion mit 4-Aminoantipyrin und N-Ethyl-N-(hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidin (TOOS) zu einem blau-violetten Farbstoff umgesetzt wird. Das Ausmaß der Bildung des Farbstoffes (also die messbare Extinktion des Farbstoffs) ist proportional zur Harnsäurekonzentration. Die Verwendung von Ascorbatoxidase im Test verhindert Interferenzen durch Ascorbinsäure.



6.18.3. Durchführung

Probe

24 h-Harn

Chemikalien

- NaCl- Lösung (9 g/L)
- dest. H₂O
- Harnsäure FS-Kit (Diagnostic Systems)

Bestandteil	Substanz	Konzentration
Reagenzlösung 1 (R1)	Phosphatpuffer (pH 7,0)	100 mmol/L
	TOOS (N-Ethyl-N-(hydroxyl-3-sulfopropyl)-m-toluidin)	1,25 mmol/L
	Ascorbatoxidase	≥ 1,25 kU/L
Reagenzlösung 2 (R2)	Phosphatpuffer (pH 7,0)	100 mmol/L
	4-Aminoantipyrin	1,5 mmol/L
	K ₄ [Fe(CN) ₆]	50 µmol/L
	POD (Peroxidase)	≥ 5 kU/L
	Uricase	≥ 250 U/L
Harnsäure- Standard (S3)	Harnsäure in H ₂ O	0,06 mg/ml (357 µmol/L)

Lagerung und Haltbarkeit

Die Reagenzien sind bei 2 – 8 °C bis zum Ende des auf der Packung angegebenen Verfallsmonats verwendbar (Kontaminationen vermeiden). Reagenzien müssen vor Lichteinstrahlung geschützt und dürfen nicht eingefroren werden!

Verbrauchsmaterialien/Geräte

- Reaktionsgefäße
- Reaktionsgefäßständer
- Halbmikro-Einmalküvetten (Volumen: 1,6 mL; Schichtdicke: 1 cm)
- Küvettenständer
- Rührspatel
- Mikropipetten (20 µL, 100 µL, 1000 µL) und Pipettenspitzen (20 µL, 100 µL, 1000 µL)
- Vortex
- UV/VIS-Photometer

Durchführung

Vorbereitung – Die Reagenzlösungen R1, R2 und S3 sind gebrauchsfertig und werden Ihnen vom Betreuer zur Verfügung gestellt. Sie müssen Ihre Harnprobe vor dem Einsatz 1 + 10 (also 1:11) mit entionisiertem Wasser verdünnen. Bitte beachten Sie hierbei, dass Sie 10 µL der verdünnten Harnprobe benötigen. Denken Sie ebenfalls daran, einen Ansatz vorzubereiten, der sinnvoll ist, d.h. sich pipettieren lässt. Die Berechnungen können Sie in der nachfolgenden freien Fläche vornehmen.

Berechnungen: verdünnter Harn: Harn + H₂O (Mischverhältnis 1 + 10)

Die vorbereiteten Ansätze werden wie im nachfolgenden Schema aufgelistet weiterverarbeitet. Dazu sollen Sie die Reagenzien einzeln in jeweils eine Halbmikro-Einmalküvette *pipettieren*.

Reagenz	Blindwert	Standard	Probe
Harn (1 + 10) (µL)	-	-	10
Harnsäure-Standard (S3)	-	10	-
H ₂ O (µL)	10	-	-
R1 (µL)	500	500	500
- Ansätze direkt in je eine Halbmikro-Einmalküvette pipettieren und mit einem Rührspatel gut vermischen - Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur → 1. Messung der Extinktion (E₁) bei 550 nm.			
R2 (µL)	125	125	125
- Reagenz R2 zu den Ansätzen in die Küvette pipettieren und wieder mit einem Rührspatel gut vermischen - Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur → 2. Messung der Extinktion (E₂) bei 550 nm Die Proben müssen innerhalb von 30 min gemessen werden und auch möglichst zeitgleich.			

6.18.4. Auswertung

Zur Ermittlung der Harnsäurekonzentrationen werden zunächst die Extinktionen für Probe und Standard durch Abzug der Blindwerte korrigiert:

$$E_{P^*} = (E_2 - E_1)_{Probe} - (E_2 - E_1)_{Blindwert}$$

$$E_{Std^*} = (E_2 - E_1)_{Standard} - (E_2 - E_1)_{Blindwert}$$

Da nach Lambert-Beer'schem Gesetz Extinktion und Konzentration einer Substanz unter gleichen Messbedingungen direkt proportional zueinander sind, gilt, dass der Quotient aus Proben- und Standard-Extinktion dem Quotienten aus Harnsäurekonzentration in Probe bzw. Standard gleich ist. Somit kann die Konzentration in der Probe direkt berechnet werden, sofern die Harnsäurekonzentration der Standardlösung bekannt ist:

$$[Harnsäure]_{Probe} = \frac{E_{P^*}}{E_{Std^*}} \cdot [Harnsäure]_{Standard}$$

Die Harnsäurekonzentration der Standardlösung beträgt 6 mg/dL (0,06 mg/ml).

Der als Probe eingesetzte Harn war verdünnt worden. Um auf die Gesamt-Harnsäurekonzentration im Original-24 h-Harn zu kommen, muss der Verdünnungsfaktor VF einkalkuliert werden:

$$[Harnsäure]_{Gesamt} = VF \cdot [Harnsäure]_{Probe}$$

Umrechnungen

Die Konzentration in mg/mL wird durch Multiplikation mit 100 bzw. 1000 in die Konzentration in mg/dL bzw. mg/L umgerechnet.

Durch Multiplikation der Konzentration in mg/dL mit dem Faktor 59,48 erhalten Sie die Konzentration in $\mu\text{mol/L}$ (Frage: wie kommt dieser Faktor zustande? Hinweis: Harnsäure hat eine molare Masse von 168,11 g)

Durch Multiplikation der Konzentration mit dem 24 h-Harn-Volumen erhalten Sie die Harnsäureausscheidung über 24 h.

Hinweis:

Sollte der Harnsäurewert über 20 mg/dL (0,2 g/L) liegen, ist dies außerhalb des linearen Bereiches für den Test, der deshalb nach weiterer Verdünnung der Harnprobe wiederholt werden muss: Die bereits verdünnte Harnprobe (1 + 10) wird nochmals 1 + 1 (1:2) mit entionisiertem Wasser verdünnt.

Die Harnsäurekonzentration berechnet sich sodann wie folgt.

$$[Harnsäure]_{Gesamt} = VF \cdot VF2 \cdot [Harnsäure]_{Probe}$$

Der Normbereich für die Ausscheidung pro Tag im Urin beträgt 0,2 – 1 g/24 h (1,2 – 6 mmol/24 h).

Legende:

E₁....Extinktion nach 1. Messung

E₂....Extinktion nach 2. Messung

E_P*...Extinktion Probe abzüglich Blindwert

E_{Std}*... Extinktion Standard abzüglich Blindwert

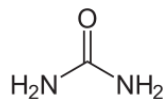
VF...Verdünnungsfaktor Harn (= 11)

VF2...Verdünnungsfaktor Harn bei nochmaliger Verdünnung (= 2)

6.19. Quantitative Bestimmung von Harnstoff

6.19.1. Allgemeines

Harnstoff (lat./engl. *urea*) entsteht als Endprodukt des Harnstoffzyklus im Rahmen des Stoffwechsels von Stickstoffverbindungen. Die Synthese erfolgt vorwiegend in der Leber sowie zu einem kleineren Teil in der Niere. Die Exkretion erfolgt hauptsächlich über die Nieren und in geringen Mengen auch über den Schweiß.

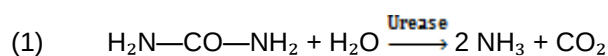


Harnstoff

Die Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Harn dient als Orientierung zur Kontrolle der Nierenfunktion. Mit dem Urin werden normalerweise 26-43 g/d bzw. 0,43-0,71 mol/d Harnstoff ausgeschieden. Die Harnstoffausscheidung kann durch viele Faktoren beeinflusst werden: Die Harnstoff-Aufnahme wird durch eine proteinreiche Ernährung sowie gastrointestinalen Blutungen erhöht. Eine katabole Stoffwechsellaage (postoperativ, Fieber, fortgeschrittene Tumoren, Strahlenbehandlung) führt zu einer Erhöhung der Harnstoff-Bildung, entsprechend führt eine anabole Stoffwechsellaage (Schwangerschaft, Kindheit), eine niedrige Proteinzufuhr (Anorexie, langanhaltende Hungerzustände), eine Störung im Harnstoffzyklus, Diarrhoe/Erbrechen oder eine eingeschränkte Leberfunktion bzw. eine Leberinsuffizienz zu einer Erniedrigung der Harnstoffkonzentration im Urin. Weiterhin kann die tubuläre Reabsorption des Harnstoffs bei verminderter Ausscheidung/Antidiurese (Durst, Exsikkose) erhöht, bzw. bei erhöhter Ausscheidung/Diurese (eingeschränkte Nierenfunktion, Niereninsuffizienz) erniedrigt sein.

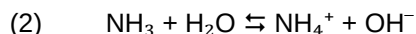
6.19.2. Prinzip der Methode

Durch Behandlung mit Urease wird der Harnstoff in Anwesenheit von Wasser in Ammoniak und Kohlendioxid hydrolysiert. Urease ist ein bakterielles Enzym, das zwar nicht vom Menschen gebildet wird, im Gastrointestinaltrakt aber dennoch vorliegt (*Frage: Warum?*).



Der freigesetzte Ammoniak wird nun mit Hilfe der Reaktion nach Berthelot bestimmt, bei der in einer mehrstufigen Reaktion Ammoniak zu Indophenol umgewandelt wird.

Zunächst wird hierbei die Lösung aus der Ureasebehandlung auf einen alkalischen pH-Wert (pH 13) gebracht. Das ist vonnöten, damit das beim pH-Wert des Ansatzes der Ureasereaktion vorhandene Ammonium vollständig in Ammoniak überführt wird – nach dem Prinzip von Le Chatelier wird das Säure/Base-Gleichgewicht von Ammonium/Ammoniak bei hohem pH-Wert auf die Seite von Ammoniaks verlagert.



Ammoniak wird nun mit Hypochlorit-Ionen zu (Mono-)Chloramin umgesetzt.



Nachfolgend reagiert das Chloramin unter Anwesenheit von Natriumnitroprussid als Katalysator mit Natriumsalicylat zu N-Chlorchinonimin, das mit weiterem Salicylat zu einem grün-blauen Indophenol reagiert. Das entstehende Indophenolderivat absorbiert bei 578 nm. Das Ausmaß der Färbung (also die Extinktion bei 578 nm) ist der Harnstoffkonzentration proportional.

6.19.3. Durchführung

Probenmaterial

24 h-Harn

Chemikalien

- entionisiertes H₂O
- NaCl (9 g/L)
- Harnstoff CT FS-Kit (Diagnostic Systems)

Bestandteil	Substanz	Konzentration
Reagenzlösung (R1)	Phosphatpuffer	120 mmol/L
	Natriumsalicylat	62 mmol/L
	Natriumnitroprussid	40 mmol/L
	EDTA	1,3 mmol/L
Reagenzlösung (R2)	Phosphatpuffer	<50 mmol/L
	Natriumhydroxid	150 mmol/L
	Natriumhypochlorit	10 mmol/L
Reagenzlösung (R1A)	R1 + R3 (Mischung 100 + 1) <i>Haltbarkeit: 14 Tage bei 2-8°C</i>	
Enzymreagenz (R3):	Urease	≥0,5 kU/mL
Harnstoff-Standardlösung (S4)	Harnstoff	50 mg/dL bzw. 0,5 mg/ml (8,33 mmol/L)

Hinweis:

Die Lösungen (R1) und (R2) sind stark ätzend. Nicht mit der Haut in Berührung bringen!

Die Reagenzien sind bei 2 – 8°C zu lagern. Des Weiteren müssen die Reagenzien vor Lichteinstrahlung geschützt werden.

Geräte

- Reaktionsgefäße
- Reaktionsgefäßständer
- Halbmikro-Einmalküvetten (Volumen: 1,6 ml; Schichtdicke: 1 cm)
- Küvettenständer
- Mikropipetten (20 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Pipettenspitzen (20 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Vortexer
- UV/VIS-Photometer

Durchführung

Die Reagenzlösungen R1A, R2 und S4 werden Ihnen vom Betreuer zur Verfügung gestellt. Berechnen Sie die Mengen für Reagenzien R1 und R3 für einen Durchlauf. Beachten Sie dabei, dass die Menge für den Blindwert, die Harnprobe und den Standard ausreichend sein müssen! Es werden 500 µL pro Ansatz benötigt.

Außerdem müssen Sie Ihre Harnprobe vor dem Einsatz 1 + 100 mit entionisiertem Wasser verdünnen. Bitte beachten Sie hierbei, dass Sie 5 µL der verdünnten Harnprobe benötigen. Denken Sie auch daran, einen Ansatz vorzubereiten, der sinnvoll ist, d.h. sich pipettieren lässt. Die beiden Berechnungen können Sie in der nachfolgenden freien Fläche vornehmen.

Berechnungen:

R1A: R1 + R3 (Mischung 100 + 1)

verdünnter Harn: Harn + H₂O (Mischung 1 + 100)

Die vorbereiteten Ansätze werden wie im nachfolgenden Schema aufgelistet weiterverarbeitet. Dazu müssen Sie die Reagenzien einzeln in jeweils ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß pipettieren.

Reagenz	Blindwert (µL)	Standard (µL)	Probe (µL)
verdünnter Harn (1 + 100)	-	-	5
Harnstoff-Standard (S4)	-	5	-
H ₂ O	5	-	-
R1A (R1+R3)	500	500	500
Jeweils 500 µL des R1A-Reagenz in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß vorlegen (vergessen Sie die Beschriftung nicht, Verwechslungsgefahr). Nun 5 µL Harnprobe, Harnstoff-Standard bzw. Wasser dazu pipettieren und mindestens 5-mal resuspendieren. Es erfolgt eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur (20-25°C).			

R2	500	500	500
Zu dem jeweiligen Reagenzgemisch werden nun jeweils 500 µl R2 Reagenz dazu pipettiert und wieder gut resuspendiert. Es erfolgt wieder eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur (20-25°C). Nach Ablauf der Zeit wird jeweils das gesamte Volumen der Harn-, Standard-, bzw. Blindwertprobe in eine Halbmikro-Einmalküvetten überführt. Nun ist zu beachten, dass Sie innerhalb von 30 min die Extinktionen des Blindwertes ($E_{\text{Blindwert}}$), des Standards (E_{Standard}) und der Probe (E_{Probe}) bei 578 nm messen müssen.			

Bitte beachten Sie, dass der Blindwert vom dem Extinktionswert des Standards und der Harnprobe subtrahiert werden müssen. Denn die Reagenzien haben eine gewisse Eigenabsorption.

6.19.4. Auswertung

Zur Ermittlung der Harnsäurekonzentrationen werden zunächst die Extinktionen für Probe und Standard durch Abzug der Blindwerte korrigiert:

$$E_{P^*} = E_{\text{Probe}} - E_{\text{Blindwert}}$$

$$E_{\text{Std}^*} = E_{\text{Standard}} - E_{\text{Blindwert}}$$

Wie für die Harnsäurebestimmung im vorigen Versuch gilt nach Lambert-Beer, dass der Quotient aus Proben- und Standard-Extinktion dem Quotienten aus Harnstoffkonzentration in Probe bzw. Standard gleich ist. Die Konzentration in der Probe kann also direkt berechnet werden, wenn die Harnstoffkonzentration der Standardlösung bekannt ist:

$$[\text{Harnstoff}]_{\text{Probe}} = \frac{E_{P^*}}{E_{\text{Std}^*}} \cdot [\text{Harnstoff}]_{\text{Standard}}$$

Die Harnsäurekonzentration der Standardlösung beträgt 50 mg/dL bzw. 0,5 mg/ml (8,33 mmol/L

Der als Probe eingesetzte Harn war verdünnt worden. Um auf die Gesamt-Harnstoffkonzentration im Original-24h-Harn zu kommen, muss der Verdünnungsfaktor VF einkalkuliert werden:

$$[\text{Harnstoff}]_{\text{Gesamt}} = VF \cdot [\text{Harnstoff}]_{\text{Probe}}$$

Umrechnungen

Die Konzentration in mg/mL wird durch Multiplikation mit 100 bzw. 1000 in die Konzentration in mg/dL bzw. mg/L umgerechnet.

Durch Multiplikation der Konzentration in mg/dL mit dem Faktor 0,1665 erhalten Sie die Konzentration in mmol/L

(Frage: wie kommt dieser Faktor zustande? Hinweis: Harnstoff hat eine molare Masse von 60,06 g)

Durch Multiplikation der Konzentration mit dem 24h-Harn-Volumen erhalten Sie die Harnstoffausscheidung über 24h.

Hinweis:

Sollte der Harnstoffwert über 40 g/dL (400 g/L) liegen, ist dies außerhalb des linearen Bereiches für den Test, der deshalb nach weiterer Verdünnung der Harnprobe wiederholt werden muss: Die bereits verdünnte Harnprobe (1 + 100) wird nochmals 1 + 2 (1:3) mit physiologischer NaCl-Lösung (9 g/L) verdünnt.

Die Harnsäurekonzentration berechnet sich dann wie folgt.

$$[Harnstoff]_{Gesamt} = VF \cdot VF2 \cdot [Harnstoff]_{Probe}$$

Der Normbereich für die Ausscheidung pro Tag im Urin beträgt 26 – 43 g/24 h (0,43 – 0,72 mol/24 h).

Legende:

E_{Blindwert}....Extinktion des Blindwertes

E_{Standard}....Extinktion des Standards

E_{Probe}....Extinktion der Probe

E_P*...Extinktion Probe abzüglich Blindwert

E_{Std}*... Extinktion Standard abzüglich Blindwert

VF...Verdünnungsfaktor Harn (= 101)

VF2...Verdünnungsfaktor Harn bei nochmaliger Verdünnung (= 3)

7. Skript zum Versuch Kalorimetrie

7.1. Einführung

Bei der Kalorimetrie handelt es sich um die Ermittlung der Enthalpien von Verbrennungs-vorgängen unter einem Überangebot an Sauerstoff in kalorimetrischen Bomben. Daher rührt auch die Bezeichnung, Enthalpiemetrie. Gemessen wird mit einem adiabatischen Kalorimeter, um eine absolute Isolierung zu gewährleisten. Es gilt der Energieerhaltungssatz, d.h. dass die aufgenommene Wärmemenge der abgegebenen Wärmemenge entspricht. Gemessen wird die Temperaturdifferenz ΔT , welche in den physikalischen Brennwert umgerechnet werden kann.

7.2. Prinzip

Messung der Bruttoenergie gemäß der Definition: Eine Kilokalorie (kcal) ist die Energiemenge, die 1 l Wasser um 1 °C (22 auf 23 °C) erwärmt. Es wird die bei Verbrennung der Probe in einem Metallgefäß (‚Bombe‘) freiwerdende Energie ermittelt, indem die Temperaturerhöhung einer definierten, die Bombe umgebenden Wassermenge gemessen wird.

Fragen zur Kalorimetrie - Recherche vor dem Praktikum !!!

1. Wo bzw. in welchem Zusammenhang wurde die Kalorimetrie ursprünglich eingesetzt?
2. Was bedeutet adiabatische, isotherme und isoperibole/anisotherme Kalorimetrie?
3. Definition und Unterschied zwischen direkter und indirekter Kalorimetrie?
4. Was ist ein Tashiri-Indikator?

7.3. Bombenkalorimeter

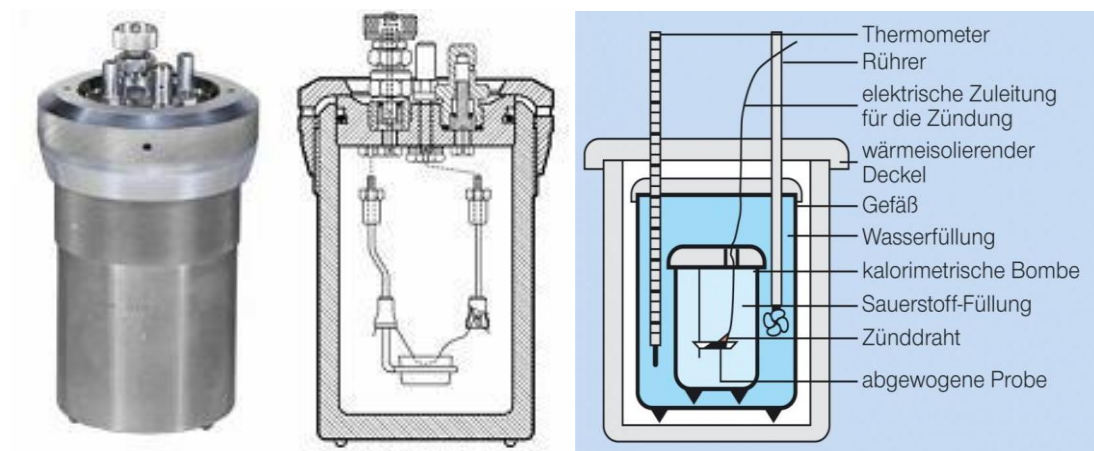


Abb. 1 Bombenkalorimeter, Parr 1351.

7.4. Kalorimetrie zur ‚Bestimmung des Brennwertes‘

7.4.1. Geräte

- Isoperiboles Kalorimeter **PARR 1261** mit Wasser-handling-System
- Kalorimeterbombe, druck- und säureresistent, verschraubbarer Deckel mit 2 Zündpolen und Ventil für Gaszu- bzw. -ableitung
- Sauerstoff-Füllvorrichtung (Flasche, Druckreduzierventil)
- Pillenpresse

7.4.2. Versuch (Kurzbeschreibung)

Mit dem (Bomben-) Kalorimeter ist es möglich, den Brennwert von festen und flüssigen Brennstoffen zu bestimmen. Der Brennstoff wird in einen Tiegel platziert und leicht von einem Zünddraht berührt. Der Tiegel wird in ein Druckgefäß (Sauerstoffbombe) eingesetzt, das mit reinem Sauerstoff bis zu 30 bar gefüllt wird. Das Gefäß wird in ein Wasserbad getaucht und die Temperaturerhöhung des Wassers durch die Verbrennung des Brennstoffes wird gemessen. Durch eine Kalibrierung ist es möglich, ausgehend von dieser Temperaturerhöhung auf den Brennwert der Substanz zurückzuschließen. Der Brennwert einer Vielzahl von Brennstoffen kann somit bestimmt werden. Brennstoffe mit einem hohen Anteil an Halogenverbindungen oder Sprengstoffe können mit dieser Apparatur nicht gemessen werden, wohl aber schwer brennbare oder pulverförmige Brennstoffe.

7.4.3. Durchführung und Berechnung

a) Kalibrierung des Kalorimeters (Wasserwert)

Ziel und Prinzip

Die Kalibrierung dient der Bestimmung der Wärmekapazität bzw. dem Wasserwert - energy equivalent [EE]; die Wärmekapazität gibt an, wieviel Energie erforderlich ist, um das System um 1 °C zu erwärmen. Als Eichsubstanz wird **Benzoessäure** mit einer Verbrennungswärme von ca. **6318 cal/g** bzw. **26452 J/g** beträgt (**1 cal = 4,1868 J**) verwendet. Hierzu werden je Bombe 5 Messungen mit einer Varianz von $v < 0,15 \%$ verwendet. Die Kalibrierung erfolgt für jede Bomben-Kalorimeter-Gefäß-Kombination und wird nach ca. 500 Messungen oder bei Änderungen am Verbrennungssystem wiederholt.

Durchführung der Kalibrierung bzw. Überprüfung der Bombe mit Benzoessäure

Es wird für jede Bomben-Kalorimetergefäß-Kombination eine extra Kalibriermessung durchgeführt. Anstatt der 5 Messungen für die Kalibrierung, wird für das Praktikum die Eichsubstanz Benzoessäure zur Überprüfung der vorliegenden Kalibration verbrannt.

- Gerät und Wassersystem einschalten, Taste **F1** drücken, um Gerät und Wassersystem auf die erforderliche Temperatur von **35 °C** zu erwärmen (ca. 30 min Vorwärmzeit) –
- Einwaage von ca. 600 mg Benzoesäure, lose Teile von Pille mit Haarpinsel entfernen, danach in Porzellantiegel auf Analysenwaage einwiegen, oder die bereits gepresste **Benzoessäuretablette** ,quantitativ‘ in Brenntiegel überführen - **wiegen**.
- Zünddraht (Eisen **10 cm**) an Zündpolen befestigen, Schlaufe biegen und auf Pille drücken
- **2 ml dest.** Wasser mit Pipette in die Bombe geben (zum Lösen der bei der Verbrennung entstehenden Mineralsäuren H_2SO_3 und HNO_3).
- Bombe zusammensetzen
- Gasauslaßventil schließen (Uhrzeigersinn = zu) und Bombe über Einlaßventil mit Sauerstoff füllen (Taste **O₂-FILL**), nach Zischgeräusch Ventil abziehen (,Bombe ist gefüllt‘).
- O₂-Druck kontrollieren: ca. 30 bar (3000 kPa)
- bei Anzeige **standby** ist das Gerät einsatzbereit – die Temperatur des Wassermantels: **jacket** beträgt **35 ± 0,05 °C**.

- Umschalten in Modus Kalibration (**STD = standardisation, mit SHIFT START**)

Zur Überprüfung des Gerätes mit Benzoesäure jedoch im Modus für die Bestimmungsmessung (**DETR = determination**) bleiben.

- das abgemessene (2000 ml) und temperierte Wasser aus handling-System (**30 °C**) in Kalorimeter-gefäß ,**bucket**‘ einlassen.
- Kalorimeter-gefäß in Kalorimeter stellen
- Bombe (zur Hälfte) in Kalorimeter-gefäß eintauchen und Zündstecker auf Polklemmen der Bombe stecken (und Bombe gänzlich einsetzen)
- Deckel schließen und Taste **START** drücken
- Eingabe von 1. Bomben-Nr. (**CAL ID**): 1 oder 2 mit **ENTER** bestätigen
- 2. Proben-Nr. (**SAMP ID**): laufende Nummer mit **ENTER** bestätigen
- 3. Gewicht der Pille (**WEIGHT**) mit **ENTER** bestätigen
- es folgen Vorperiode (**PRE**), Zündung (**piep-Ton**), Hauptperiode (Temperaturanstieg) und Nachperiode (Temperaturabfall) (**POST**).

[bei DYNAMIC gegenüber STANDARD mode ist die Versuchsdauer um 2 min kürzer]

- zur Veranschaulichung nach der Zündung die **bucket**-Temperaturen notieren und eine entsprechende Kurve zeichnen.
- am Ende der Verbrennung (wiederholter **piep-Ton**), Deckel öffnen, Pole entfernen und Bombe mit Zange aus Kalorimetergefäß heben, entgasen (Ventil entgegen Uhrzeigersinn) und Deckel (der Bombe) aufschrauben.
- Bombe mit destill. Wasser (Spritzflasche) ausspülen und in Erlenmeyer füllen; nach Zugabe von 2-3 Tropfen **Tashiro-Indikator** mit 0,0709 n NaOH titrieren (1 ml = 1 cal).

-
- die Berechnung der Wärmekapazität (**EE**) erfolgt intern nach der Regnault-Pfaundler'schen Formel (Temperaturkorrektur) unter Berücksichtigung von
 - Temperaturanstieg und -abfall in Haupt- und Nachperiode
 - Verbrennungswärme Zünddraht
(verbrannter Anteil ca. 6,5 cm, entspricht ~ 15 cal bei 2,3 cal/cm)
 - **Wärme aus Säurebildung** (HNO_3), ca. 10 cal je Verbrennung,
Korrektur je nach Säuremenge: Titration ml 0,0709 n NaOH
(nicht H_2SO_4 , Benzoesäure ist S-frei)
 - Eingabe der Korrekturwerte (Abzug der Wärmebildung durch Draht und Säurebildung) über Taste **Skip**:
 1. **15** (für den Zünddraht, siehe oben) eingeben **ENTER**
 2. verbrauchte **NaOH in ml** eingeben **ENTER**

Die Ergebnisse werden automatisch ausgedruckt.

- Wasser aus Kalorimeter-gefäß in Wassersystem zurückschütten und den Hahn auf ‚Zirkulation‘ drehen - Aufwärmen bzw. temperieren für den nächsten Versuch.
- Gefäß (mit Tuch) gut austrocknen.

[- nach Umschalten in den Bestimmungsmodus wird automatisch (nur bei Code *215...*285=off) der Mittelwert der im Speicher befindlichen EE-Werte für die entsprechende CAL-ID gespeichert; - es sollten nur ausgewählte Kalibrierläufe zur Bildung von Mittelwert und relativer Standardabweichung (Variationskoeffizient) verwendet werden; hierzu werden die ‚ungültige‘ SAMPLE-ID gelöscht (Code *20) und anschließend die neuen Werte gespeichert (Code *30).].

b) Brennwert der Probe

Prinzip

Temperaturveränderung des Wassers im Kalorimetergefäß

Vorperiode, Hauptperiode (dynamische Methode, 2 min kürzer)

Vorperiode, Hauptperiode, Nachperiode (exakte Methode, länger)

Probenmaterial

Gefriergetrocknet Lebensmittel (wie Quark, Klöße, oder Buttererbsen).

Es werden ca. 0,7 Gramm des ausgewählten Lebensmittels eingewogen und mit Hilfe der Pillenpresse zu einer Tablette gepresst - exaktes Gewicht der Tablette bestimmen!

Durchführung

- Gewicht der Lebensmitteltabelle bestimmen, und in Brenntiegel geben.
- Zünddraht befestigen, 2 ml Wasser in die Bombe geben.
- Bombe zusammensetzen und mit Sauerstoff füllen.
- Wassergefäß und Bombe in Kalorimeter einsetzen und Gerät starten
- **DETR = determination**, ggf. mit Tastenfolge **SHIFT START** in den Bestimmungsmodus (*103 ET STEP ET RESET) wechseln.
- weiterer Ablauf analog Kalibrierung, nur dass anstelle der Benzoesäure die zu untersuchende Substanz verwendet wird.
- Berechnung intern unter Verwendung der Wärmekapazität (EE) und ggf. einer Korrektur für Wärme aus Schwefelgehalt (nur bei Brennstoffen nötig)
- Nach der Verbrennung Bombe herausnehmen, Gas ablassen, öffnen und mit dest. Wasser ausspülen.
- Eingabe der Brennwerte des Drahtes (**15**) und der über die Titrationsmittel ermittelten Säuren.
- Druck der Ergebnisse erfolgt automatisch nach Eingabe der entsprechenden Korrekturwerte für Zünddraht und Säure – **Gross Heat in MJ/Kg** der Gefriertrockensubstanz.

- Umrechnung auf die Frischmasse der Probe:

Bruttoenergie [MJ/kg] = Bruttoenergie der Probe [MJ/Kg] * Faktor der Gefriertrocknung

(z.B. GTS Rotkohl = 156,6g/kg Frischmasse (FM); Klöße = 228,7 g/Kg FM)

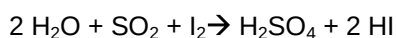
8. Wassergehalt und Trockensubstanz

8.1. Wassergehalt (Karl-Fischer-Titration)

8.1.1. Prinzip der Methode

Zur korrekten Bestimmung des Wassergehalts kann die sogenannte Karl-Fischer-Titration verwendet werden.

Wird häufig bei Lebensmitteln mit sehr geringem Wassergehalt angewandt. Vorteil ist, dass das Wasser spezifisch und selektiv erfaßt wird, da der Bestimmung eine chemische Reaktion mit Wasser zugrunde liegt (Bunsengleichung):



Es gibt zwei prinzipielle Verfahren zur Dosierung des Titrationsmittels:

- **volumetrische** Dosierung einer methanolischen Iodlösung in das Karl-Fischer-Reagenz
- **coulometrische** Erzeugung des Iods auf elektrochemischem Weg direkt in dem Karl-Fischer-Reagenz.

Wichtigste Vorschriften nach AS § 35 LMBG

Im Praktikum wird der Titrator „TitroLine KF“ (Fa. Schott) eingesetzt, dem die **volumetrische** Dosierung zugrunde liegt.

8.1.2. Allgemeines Vorgehen:

Austitrieren des Lösungsmittels:

- Automatische Bürette füllen
- ca. 30 ml „trockenes“ Methanol (bzw. Gemisch mit Toluol, Chloroform oder anderen Lösungsmitteln für Fette) in das Titriergefäß füllen
- da das Methanol jedoch nicht absolut H₂O-frei ist, muß es vor Beginn der eigentlichen Titration mit dem Messreagenz (Hydranal) „trocken titriert“ werden (Konditionierung)
- dabei wird titriert, bis das Meßgerät für mind. 10 sec. (je nach Vorgabe) eine konstante Spannung ermittelt („Endpunkt“).

Titration der Analyse:

- in das Titriergefäß wird die Probe mit einem Wägetrichter über den Einfüllstutzen zugegeben (Probenmenge mit ca. 1-100 mg Wasser je Einwaage)
- Einwaage eingeben oder von der Waage übertragen lassen (print-Taste)

-
- 1-5 min rühren lassen
 - Titration starten und bis zum Endpunkt titrieren
 - Messwerte notieren, drucken oder speichern
 - in die jetzt wiederum austitrierte Lsg. kann nun direkt die nächste Probe gegeben werden (sollte das Gefäß bereits fast voll sein, wird ein Teil der Lösungsmittels ausgetauscht und vor der nächsten Analyse wieder konditioniert)

8.1.3. Arbeitsschritte

- Titrator einschalten
- warten, bis „Probentitration“ angezeigt wird (= letztes Ergebnis)
- Stopfen der Belüftungen entfernen und Titrier-Gefäßfüllung prüfen, ggf. Methanol oder Methanol-Lösungsmittel-Gemisch (MLG; M > 25 % besser > 50 %, bei Chloroform M > 35 %) wechseln oder ergänzen
- Start-Taste drücken
- Konditionierung abwarten
- Start-Taste drücken
- Probenbezeichnung eingeben (oder lfd. Nr. akzeptieren)
- F1-Taste drücken
- Einwaage vorbereiten (befüllte/n Einmal-Spritze bzw. Wäge-Trichter mit Spatel auf Waage legen und Tara-Taste drücken) bzw. Direkteinwaage mit Glasspatelstopfen bei Fett (Spatel verbleibt während der Titration im Titrationsgefäß)
- berechnete Probenmenge (ca. 1-100 mg Wasser) in Titriergefäß einfüllen (Stopfen wieder aufsetzen)
- Rückwaage der/s Einmalspritze bzw. Wägetrichters
- Masse-Differenzbetrag als Einwaage über Tasten eingeben oder Waagen-print-Taste drücken (bei angeschlossenem Kabel)
- ggf. für Probenart festgelegte Zeit warten (Lösung der Probe im Lösungsmittel)
- F1-Taste drücken
- Titration abwarten (kann von wenigen sec bis >10 min dauern)
- Ergebnis notieren oder an PC schicken (wenn angeschlossen)
- Start-Taste für nächste Proben drücken
- am Ende der Messungen oder bei vollem Titrier-Gefäß MLG wechseln
- Gerät ausschalten
- Lüftungen mit Stopfen verschließen

Geräte

- | | |
|---|--------------------|
| - Titrator, | - Einmalspritzen |
| - Präzisionswaage 0,1 mg mit Data-Interface | - Glasspatelstopfe |
| - Wägetrichter | |

Chemikalien

- KF-Reagenz, Titer 5, 2 und 1 mg H₂O/ml (z.B. "Hydranal-Composite" [universal einsetzbar]),
- Methanol < 0,01 % Wasser
- Toluol (umweltfreundlicher) oder Chloroform (nur bei nicht emulgierten Fetten einsetzen, „Sumpf“ → chlorierte Abfälle) als Lösungsvermittler für Lipide
- Formamid als Lösungsvermittler für Kohlenhydrate, Eiweiße und anorganische Salze (ist mit Toluol aber nicht mit Chloroform mischbar: Methanol >35 % Toluol ≈30 % Formamid≈30 %)

Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

in Abhängigkeit der Empfindlichkeit des Titrationsreagenz

r = 0,27 ... 0,54 % R = 0,54 1,08

8.1.4. Besonderheiten (volumetrische Methode)

- Säuren und Laugen (z.B. HCL, Essigsäure, Natronlauge) müssen neutralisiert werden – trifft nicht zu auf schwach saure Lebensmittel (Sauerkraut, saure Gurken usw.)
- Naturstoffe, die H₂O nur langsam abgeben, können im heißen (50 °C) oder siedenden Methanol titriert werden (Heiz-Rührplatte verwenden), Achtung Druckerhöhung im Titriergefäß!
- schlecht lösliche Proben können vor der Analyse in einem MLG gelöst werden: Ultraschallbad, exakte Konzentration 1 Teil Probe : n Teile MLG, Blindwert (BW) vom MLG bestimmen; wenn das Lösungsverhältnis (z.B. 1:10) stets gleich gehalten und eine einheitliche Probendosierung (z.B. 1 ml) verwendet wird, kann der BW bereits in der Berechnungsformel eingegeben werden, es erfolgt dann ein Abzug der ml KF-Reagenz für den BW von den ml KF-Reagenz für die pipettierte Probenlösung:
- bei Verwendung von Chloroform als Lösungsvermittler und Proben mit sehr wenig Wasser ist die Titrationsgeschwindigkeit zu verringern (Menü: „Stufe 2“ gegenüber normal „Stufe 1“)
- bei fetthaltigen Proben **vor** der Konditionierung auf 3 Teile Methanol 1 Teil Toluol in das Titriergefäß zusetzen

8.2. Trockensubstanz

8.2.1. Prinzip der Methode

Die Probe wird direkt oder nach Verreiben mit Seesand im Trockenschrank bei 103 ± 2 °C bis zur Massekonstanz getrocknet und der Rückstand durch Differenzwägung ermittelt.

Wichtigste Vorschriften nach AS § 35 LMBG

01.00-27, 03.00-9, 05.00-12, 06.00-3, 16.01-1, 17.00-1 (Trocknungsverlust bei Brot), 04.00-5 bis 7 (fettfreie Trockenmasse bei Butter)

8.2.2. Durchführung

Vortrocknen (LTS):

- Einwaage 200 - 1000 g (auf 0,1 g)
- Trocknung bei 40 - 60 °C (einige Stunden)
- 2 - 3 h Stehen an der Luft
- Rückwaage

Nachtrocknen (ATS):

- Einwaage 1 - 4 g (auf 0,1 mg) in vorgetrocknete und gewogene Tiegel
- Trocknung bei 103 ± 2 °C bis zur Massekonstanz
- Abkühlung im Exsikkator (ca. 30 min)
- Rückwaage

8.2.3. Berechnung

$$\text{LTS [g/100 g FM]} = \frac{\text{Rückwaage (60 °C) [g]}}{\text{Einwaage [g FM]}} \cdot 100$$

$$\text{ATS [g/100 g LTS]} = \frac{\text{Rückwaage (103 °C) [g]}}{\text{Einwaage [g LTS]}} \cdot 100$$

$$\text{TS [g/100 g FM]} = \frac{\text{ATS} \cdot \text{LTS}}{100}$$

Bei Lebensmitteln, bei denen keine Vortrocknung erforderlich ist, wird sofort bei 103 ± 2 °C getrocknet. Die Berechnung erfolgt dann nach:

$$\text{TS [g/100 g FM]} = \frac{\text{Rückwaage (103 °C) [g]}}{\text{Einwaage [g FM]}} \cdot 100$$

TS = Trockensubstanz (auch als Trockenmasse bezeichnet)
LTS = Lufttrockensubstanz
ATS = Analysentrockensubstanz
FM = Frischmasse

8.3. Asche

Prinzip der Methode

Die Probe wird (ggf. nach Vortrocknung) im Muffelofen verascht und ihr Glührückstand durch Differenzwägung ermittelt.

Wichtigste Vorschriften nach AS § 35 LMBG

05.00-13, 06.00-4, 16.01-2, 17.00-3

8.3.1. Durchführung

- Einwaage 2 - 6 g (auf 0,1 mg)
- Veraschung bei 550 - 600 °C bis zur Massekonstanz
- Abkühlung im Exsikkator (ca. 1,5 h)
- bei dunkler Asche mit einigen Tropfen 30 %igem H₂O₂ befeuchten, trocknen und nochmals veraschen
- Rückwaage

8.3.2. Berechnung

$$A \text{ [g/100 g]} = \frac{\text{Rückwaage [g]}}{\text{Einwaage [g]}} \cdot 100$$

Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

$$r = 0,13 \text{ g/100 g} \qquad R = 0,25 \text{ g/100 g}$$

9. Volumetrische Bestimmung des Invertzuckergehaltes im Honig

9.1. Allgemeines

Honig ist ein von Honigbienen und bestimmten Ameisenarten zur eigenen Nahrungsvorsorge erzeugtes und vom Menschen genutztes Lebensmittel aus dem Nektar von Blüten oder den zuckerhaltigen Ausscheidungsprodukten verschiedener Insekten, dem sogenannten Honigtau.

Im Honig sind bisher über 187 verschiedene Inhaltsstoffe wissenschaftlich festgestellt worden. Die Hauptbestandteile des Honigs sind Zucker und Wasser. Der Wassergehalt eines reifen Honigs liegt zwischen 15 bis 20 %, darf allerdings im Allgemeinen 20 % nicht übersteigen. Zucker macht den größten Anteil aus. Saccharose, ein Disaccharid, setzt sich aus Glucose (Traubenzucker) und Fructose (Fruchtzucker) zusammen, ist allerdings mit 1-5 % eher in geringer Konzentration im Honig vorhanden. Glucose und Fructose machen den größten Teil des Gesamtzuckergehaltes aus. Die Zusammensetzung kann je nach Honigsorte sehr unterschiedlich sein. Die mengenmäßig wichtigsten Inhaltsstoffe sind

- Fructose 27 bis 44 %,
- Glucose 22 bis 41 %,
- Saccharose bis zu 5 %,
- Maltose 4 bis 14 %,
- weitere Mehrfachzucker 1 bis 14 %.

Nektar und Honigtau enthalten deutlich mehr Saccharose als Honig. Ein Grund dafür liegt in der Verarbeitung. Beim Vorgang des Wasserentzuges wird der Honig eingedickt, wodurch die Saccharose durch das Enzym Invertase (im Bienenspeichel) in seine Bestandteile zerlegt wird. Weitere typische Inhaltsstoffe sind andere Zuckerarten, Pollen, Mineralstoffe, Proteine, Enzyme, Aminosäuren, Vitamine, Farb- und Aromastoffe. Honig kann flüssig oder auch fest (kristallisiert) sein. Das hängt hauptsächlich von dem Verhältnis der beiden Einfachzucker Frucht- und Traubenzucker zueinander ab, aber auch davon, wie der Honig weiterverarbeitet und gelagert wird.

Als Invertzucker (Invertose) bezeichnet man ein Gemisch, das aus Fruchtzucker (Fructose) und Traubenzucker (Glucose) besteht, und durch Umwandlung von Kristallzucker (Saccharose) entstanden ist. Invertzucker kommt auch in Honig vor. Invertzucker hat den Vorteil, dass dieses Gemisch nicht mehr kristallisiert.

9.2. Nachweismöglichkeit

Bei der Herstellung von Invertzucker entsteht auch eine Substanz namens Oxymethylfurfurol, welche gleichzeitig als Nachweis von Invertzucker herangezogen werden kann. So lässt sich unabhängig vom Zutatenverzeichnis nachweisen, ob ein Lebensmittel mit Invertzuckercreme oder mit Bienenhonig hergestellt wurde. In Bienenhonig ist Oxymethylfurfurol nämlich nicht enthalten. Auf Grund der möglicherweise auftretenden Verfälschungen ist der Nachweis von Invertzucker im Honig wichtig.

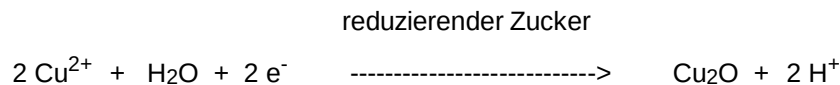
9.3. Gesetzliche Regelungen

Blütenhonig muss gemäß § 2 der HonigV mindestens 60 g/100 g an Fructose und Glucose in Summe enthalten, Honigtauhonig mindestens 45 g/100 g.

9.4. Prinzip der Methode

Mit der Methode nach Luff-Schoorl werden alle reduzierenden Zucker einer Probelösung summarisch bestimmt. Reduzierende Zucker sind Zucker, die eine Aldehydgruppe haben (Aldosen) und daher als reduzierendes Agens wirken.

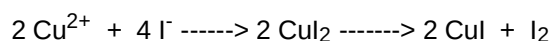
Die Luff-Schoorl-Methode wird häufig angewendet in der Weinanalytik oder zur Bestimmung des Zuckergehaltes in verschiedenen Säften und in Honig. Soll die Konzentration eines bestimmten reduzierenden Zuckers ermittelt werden, ist dies nur möglich, wenn in der alkalischen Lösung keine weiteren reduzierenden Zucker enthalten sind. Ist dies nicht der Fall, sind z. B. Glucose und Fructose gemeinsam vorhanden und die Konzentrationen beider unbekannt, so kann nur der Summenparameter ermittelt werden. Reduzierende Zucker einer Probe werden - nach Abtrennung und Klärung - durch die sogenannte Luffsche Lösung unter Kochen umgesetzt. Reduzierende Zucker können Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ reduzieren, während sie selbst oxidiert werden.



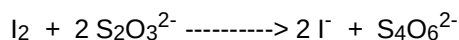
Cu_2O fällt als Niederschlag aus

Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, indem die Lösung mit den reduzierenden Zuckern mit einer definiert hergestellten Kupfer(II)-Ionen-haltigen, carbonatalkalischen Lösung (Luffsche Lösung) versetzt und erhitzt wird. Die Umsetzung erfolgt nicht stöchiometrisch. Daher müssen die Reaktionsbedingungen genau eingehalten werden.

Die Luffsche Lösung ist dabei ein definiertes Gemisch aus drei verschiedenen Teillösungen. Teillösung 1 enthält Citronensäure. Sie dient als Komplexierungsmittel, um die Bildung von Kupfer(II)-hydroxid $\text{Cu}(\text{OH})_2$ im Alkalischen zu vermeiden. Teillösung 1 wird mit einer Natriumcarbonat-haltigen Teillösung 2 gemischt. Schließlich wird hierzu die dritte Teillösung hinzugegeben. Sie enthält das für die Reaktion wichtige Kupfer(II)-sulfat. Durch die Menge an Natriumcarbonat kann der pH-Wert des Gemisches auf pH 9,3-9,4 eingestellt werden. Die reduzierten Kupferionen fallen dann als Cu_2O aus. Nun wird der noch vorhandene Überschuss an Cu^{2+} -Ionen iodometrisch bestimmt. Sie bilden aus im Überschuss zugesetztem Kaliumiodid zuerst CuI_2 , bevor daraus unlösliches CuI und I_2 entstehen.



Die Iodmoleküle werden anschließend durch Natriumthiosulfat ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) zu I^- -Ionen reduziert.



Nach Berücksichtigung eines Blindwertes kann aus dem Verbrauch an Thiosulfat der Gehalt an reduzierenden Zuckern anhand einer Tabelle ermittelt werden.

Zur Beseitigung störender Substanzen oder zur Aufhellung ist in der Regel eine Klärung nötig. Eine weite Verbreitung hat die Klärung nach Carrez erlangt. Die Carrez-Klärung dient zur Ausfällung von Proteinen, zur Beseitigung von Trübungen und zum Brechen von Emulsionen, die die anschließenden Bestimmungen stören würden. Dabei wird in der Zuckerlösung aus Kaliumhexacyanoferrat(II) und Zinksulfat unlösliches Zinkhexacyanoferrat(II) gebildet, das die Störsubstanzen adsorptiv mitreißt. Der Niederschlag kann anschließend leicht durch Filtration oder Zentrifugation von der klaren Probelösung abgetrennt werden.

9.5. Bestimmung reduzierender Zucker nach LUFF-SCHOORL

Geräte

- | | |
|---------------------------|------------------|
| - 300-mL-Erlenmeyerkolben | - Messkolben |
| - Rückflusskühler | - Bürette |
| - Stoppuhr | - Messzylinder |
| - Heizplatte | - Siedesteinchen |
| - Eiswasserbad | - Faltenfilter |

Chemikalien

- Schwefelsäure, 25 % (g/v)
- Kaliumiodid
- Stärke-Lösung, 1 % (g/v), frisch angesetzt
- Natriumthiosulfat-Maßlösung, c = 0,1 mol/L
- **CARREZ-Lösung I:** 150 g $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ in 1000 mL dest. Wasser lösen
- **CARREZ-Lösung II:** 230 g Zinkacetat $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1000 mL dest. Wasser lösen
- **Luffische Lösung:**
 Teil A: 50 g Citronensäure in 50 mL lauwarmem dest. Wasser lösen,
 Teil B: 143,7 g Na_2CO_3 (wasserfrei) in 350 mL lauwarmem dest. Wasser lösen. Nach Abkühlen beide Lösungen vorsichtig in 1-L-Messkolben mischen.
 Teil C: 25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 100 mL dest. Wasser vorlösen, in den Messkolben geben und bis zur Marke mit dest. Wasser auffüllen. Die Lösung durch einen Faltenfilter in eine Braunglasflasche filtrieren. Die Lösung ist filtriert unbegrenzt haltbar.

9.5.1. Durchführung

Reduzierende Zucker einer Probe werden - nach Abtrennung und Klärung - durch die sogenannte Luffische Lösung unter Kochen umgesetzt.

Probe: Honig

Probenvorbereitung: Klärung nach CARREZ zur quantitativen Abtrennung der Proteine:

0,5 g Honig werden in einen 250-mL-Messkolben pipettiert und mit ca. 100 mL dest. Wasser versetzt. Nach Zugabe von 5 mL CARREZ-Lösung I und kräftigem Schütteln werden 5 mL CARREZ-Lösung II zugegeben und erneut gut umgeschüttelt. Der Messkolben wird mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt und nach 10 min Stehenlassen filtriert.

Oxidation der reduzierenden Zucker mit Kupfer(II)-Ionen

Die zur Bestimmung eingesetzte Probenlösung sollte nicht mehr als 50 mg reduzierende Zucker (als Glucose) in 25 mL enthalten, ansonsten ist entsprechend zu verdünnen.

25,0 mL Luffsche Lösung und 25,0 mL des evtl. verdünnten Probenfiltrats werden in einen 300-mL-Erlenmeyerkolben pipettiert. Nach Zugabe von Siedesteinchen wird der Kolben mit dem Rückflusskühler verbunden und der Inhalt auf einer vorgeheizten Heizplatte innerhalb von 2 min zum Sieden erhitzt. Nach genau 10 min Sieden (Stoppuhr!) wird sofort mit kaltem Wasser abgekühlt.

Sollte die über dem rotbraunen Niederschlag von Kupfer(I)-Oxid stehende Lösung keine hell- blaue Färbung aufweisen, so ist der Überschuss an Kupfer(II)-Ionen verbraucht. Der Ansatz ist dann mit einer entsprechend verdünnten Lösung zu wiederholen.

Iodometrische Titration des Kupfer(II)-Überschusses

Der erkalteten, oxidierten Probenlösung werden 3 g Kaliumiodid oder 10 ml Kaliumiodid- Lösung und unter vorsichtigem Umschwenken 25 mL Schwefelsäure (25 %) zugegeben. Nach Zugabe von 1 mL Stärkelösung wird mit Natriumthiosulfat-Maßlösung (0,1 mol/L) bis zum Verschwinden der Blaufärbung titriert.

Bei Verbräuchen unter 5 mL oder über 20 mL an Natriumthiosulfat-Maßlösung muss eine günstigere Verdünnung gewählt werden.

Blindversuch

Wenn eine Probelösung keine reduzierenden Substanzen enthält, ist die Konzentration an Kupfer(II)-Ionen maximal. Demnach entsteht auch eine maximale Menge an I_2 , die den höchstmöglichen Verbrauch an Thiosulfat ($S_2O_3^{2-}$) verursacht. Ist in der Probe dagegen viel reduzierender Zucker vorhanden, wird eine große Menge Cu^{2+} reduziert, d. h. weniger Iodmoleküle (I_2) entstehen, der Verbrauch an $S_2O_3^{2-}$ ist geringer.

Der Blindversuch wird wie oben beschrieben durchgeführt. Statt der Probenlösung werden 25 mL dest. Wasser eingesetzt.

9.6. Auswertung

Der Verbrauch an Natriumthiosulfat-Maßlösung c in ml, der der Menge an vorliegenden, direkt reduzierenden Zuckern entspricht, errechnet sich nach:

$$c \text{ [ml]} = b - a$$

a : Verbrauch an Natriumthiosulfat-Maßlösung (0,1 mol/L) in ml im Hauptversuch vor der Inversion

b : Verbrauch an Natriumthiosulfat-Maßlösung (0,1 mol/L) in ml im Blindversuch

Der Wert c wird verwendet, um aus der nachfolgenden Tabelle (Tab. 1) die Menge an reduzierenden Zuckern in der Probenlösung abzulesen. Dieser Wert bezieht sich auf das eingesetzte Volumen (25 mL) der Probenlösung. Für das Endergebnis müssen eventuelle Verdünnungen und die Probeneinwaage berücksichtigt werden. Die Angabe des Ergebnisses erfolgt in g/L Probe (bei festen Proben in g/100 g), gerundet auf eine Nachkommastelle.

Tab. 1: Ermittlung des Gehalts an reduzierenden Zuckern (Glucose, Fructose, Lactose, Maltose) mit Luffscher Lösung, 10 min Kochzeit (Matissek, Steiner, Fischer, 2010)

c [ml]	I [mg]	Δ	L [mg]	Δ	M [mg]	Δ
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0
7	17,2	2,5	25,8	3,7	27,5	4,0
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3
19	50,0	3,0	71,7	4,0	75,5	4,4
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6
23	62,2		88,0		94,6	

c Verbrauch an Natriumthiosulfat-Maßlösung (0,1 mol/l), der der Menge an reduzierenden Zuckern entspricht

I Glucose, Fructose als Invertzucker: $C_6H_{12}O_6$

L Lactose, wasserfrei: $C_{12}H_{22}O_{11}$

M Maltose, wasserfrei: $C_{12}H_{22}O_{11}$

Δ Differenz zum nachstehenden Wert der Spalte

9.7. Aufgabe

Untersuchen Sie Ihre Probe auf die Gehalte an Glucose und Fructose in Summe. Beurteilen Sie anhand des Ergebnisses die Verkehrsfähigkeit des Honigs im Hinblick auf die Honigverordnung. Fertigen Sie ein Protokoll über diesen Versuch an.

9.8. Vorbereitung auf den Versuch

Folgende Themenkomplexe sollten vor Versuchsbeginn erarbeitet werden:

- ✓ Reduzierende Zucker
- ✓ Volumetrie
- ✓ Honigverordnung

Literatur

- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Nr. L 31.00-11 Honigverordnung vom 16.01.2004
- Maier, H. G.: Lebensmittel- und Umweltanalytik, Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1990 Matissek, R., Steiner, G., Fischer M.: Lebensmittelanalytik, 4. Auflage, Springer, Berlin, 2010. Rauscher, K., Engst, R., Freimut U. (REF): Untersuchung von Lebensmitteln, 2. Auflage, VEB Fachbuchverlag Leipzig, 1986
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Honig>
- <http://www.honig-schmidt.de/honig/inhaltsstoffe.html> <http://www.bee-info.de/honig/honig-inhaltsstoffe.html>

Honigverordnung (HonigV)

HonigV

Ausfertigungsdatum: 16.01.2004

Vollzitat:

"Honigverordnung vom 16. Januar 2004 (BGBl. I S. 92), die zuletzt durch Artikel 9 der Verordnung vom 8. August 2007 (BGBl. I S. 1816) geändert worden ist"

Stand: Zuletzt geändert durch Art. 9 V v. 8.8.2007 I 1816

Mit dieser Verordnung wird die Richtlinie 2001/110/EG des Rates vom 20. Dezember 2001 über Honig (ABl. EG 2002 Nr. L 10 S. 47) in deutsches Recht umgesetzt.

Fußnote

(+++ Textnachweis ab: 29.1.2004 +++)
(+++ Amtlicher Hinweis des Normgebers auf EG-Recht:
Umsetzung der
EGRL 110/2001 (CELEX Nr: 301L0110) +++)

Eingangsformel

Das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft verordnet auf Grund

- des § 19 Abs. 1 Nr. 1, 2 Buchstabe b, Nr. 3 und 4 Buchstabe a und c des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 9. September 1997 (BGBl. I S. 2296), der durch Artikel 42 Nr. 4 der Verordnung vom 29. Oktober 2001 (BGBl. I S. 2785) geändert worden ist, in Verbindung mit § 1 des Zuständigkeitsanpassungsgesetzes vom 16. August 2002 (BGBl. I S. 3165) und dem Organisationserlass vom 22. Oktober 2002 (BGBl. I S. 4206) im Einvernehmen mit dem Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit sowie
- des § 44 Abs. 1 Nr. 2 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes:

§ 1 Anwendungsbereich

Die in Anlage 1 aufgeführten Erzeugnisse unterliegen dieser Verordnung, soweit sie dazu bestimmt sind, als Lebensmittel gewerbsmäßig in den Verkehr gebracht zu werden.

§ 2 Anforderungen an die Beschaffenheit

Honig muss hinsichtlich seiner Beschaffenheit den Anforderungen nach Anlage 2 entsprechen.

§ 3 Kennzeichnung

(1) Für die in Anlage 1 aufgeführten Erzeugnisse sind die dort genannten Bezeichnungen Verkehrsbezeichnungen im Sinne der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung.

(2) Die in Anlage 1 genannten Bezeichnungen sind den dort aufgeführten Erzeugnissen vorbehalten. Diese Bezeichnungen können außer bei Erzeugnissen nach Anlage 1 Abschnitt II Nr. 3, 4, 8 und 9 durch die Bezeichnung "Honig" ersetzt werden.

(3) Die in Anlage 1 genannten Bezeichnungen können außer bei Erzeugnissen nach Anlage 1 Abschnitt II Nr. 8 und 9 ergänzt werden durch Angaben

1. zur Herkunft aus Blüten oder lebenden Pflanzenteilen, wenn der Honig vollständig oder überwiegend den genannten Blüten oder Pflanzen entstammt und die entsprechenden organoleptischen, physikalisch-chemischen und mikroskopischen Merkmale aufweist;

2. zur regionalen, territorialen oder topographischen Herkunft, wenn der Honig ausschließlich die angegebene Herkunft aufweist;
3. zu besonderen Qualitätsmerkmalen.

(4) Zusätzlich zu den nach der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung vorgeschriebenen Angaben muss die Kennzeichnung der in Anlage 1 aufgeführten Erzeugnisse folgende Angaben enthalten, die nach Maßgabe des Absatzes 5 anzugeben sind:

1. das Ursprungsland oder die Ursprungsländer, in dem oder denen der Honig erzeugt wurde; bei mehr als einem Ursprungsland kann stattdessen jeweils eine der folgenden Angaben gemacht werden, sofern der Honig dort erzeugt wurde:
 - a) "Mischung von Honig aus EG-Ländern",
 - b) "Mischung von Honig aus Nicht-EG-Ländern",
 - c) "Mischung von Honig aus EG-Ländern und Nicht-EG-Ländern",
2. den Hinweis "nur zum Kochen und Backen" bei Erzeugnissen nach Anlage 1 Abschnitt II Nr. 9.

(5) Die Angabe nach Absatz 4 Nr. 2 ist in Verbindung mit der Verkehrsbezeichnung anzubringen. Im Übrigen gilt für die Art und Weise der Kennzeichnung nach Absatz 4 § 3 Abs. 3 Satz 1, 2 und 3 erster Halbsatz und Abs. 4 der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung entsprechend.

(6) Bei Erzeugnissen nach Anlage 1 Abschnitt II Nr. 8 und 9, die nicht zur Abgabe an Verbraucher bestimmt sind, sind die Verkehrsbezeichnungen auf den Transportbehältern, den Verpackungen und in den Geschäftspapieren anzugeben; dem Verbraucher stehen Gaststätten, Einrichtungen zur Gemeinschaftsverpflegung sowie Gewerbetreibende, soweit sie Lebensmittel zum Verbrauch innerhalb ihrer Betriebsstätte beziehen, gleich.

§ 4 Verkehrsverbote

Gewerbsmäßig dürfen nicht in den Verkehr gebracht werden:

1. Lebensmittel, die mit einer in Anlage 1 aufgeführten Bezeichnung versehen sind, ohne den in Anlage 1 genannten Begriffsbestimmungen oder den Vorschriften des § 2 zu entsprechen,
2. Honig, dessen Bezeichnung durch die in § 3 Abs. 3 vorgesehenen Angaben ergänzt ist, ohne den dort genannten Anforderungen zu entsprechen,
3. Erzeugnisse im Sinne der Anlage 1, die nicht mit einer nach § 3 Abs. 4, auch in Verbindung mit Abs. 5 Satz 1, oder Abs. 6 vorgeschriebenen Angabe versehen sind.

§ 5 (weggefallen)

-

§ 6 Straftaten und Ordnungswidrigkeiten

(1) Nach § 59 Abs. 1 Nr. 21 Buchstabe a des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches wird bestraft, wer entgegen § 4 Nr. 1 oder 2 Lebensmittel in den Verkehr bringt.

(2) Wer eine in Absatz 1 bezeichnete Handlung fahrlässig begeht, handelt nach § 60 Abs. 1 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches ordnungswidrig.

(3) Ordnungswidrig im Sinne des § 60 Abs. 2 Nr. 26 Buchstabe a des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches handelt, wer vorsätzlich oder fahrlässig entgegen § 4 Nr. 3 ein Erzeugnis in den Verkehr bringt.

§ 7 Übergangsregelung

Bis zum 31. Juli 2004 dürfen Erzeugnisse nach den bis zum 28. Januar 2004 geltenden Vorschriften hergestellt und gekennzeichnet werden. Nach Satz 1 hergestellte und gekennzeichnete Erzeugnisse dürfen bis zum Abbau der Vorräte in den Verkehr gebracht werden.

§ 8

-

§ 9 Inkrafttreten, Außerkrafttreten

(1) Die Verordnung tritt am Tag nach der Verkündung in Kraft.

(2)

Schlussformel

Der Bundesrat hat zugestimmt.

Anlage 1 (zu den §§ 1, 3 und 4)

Begriffsbestimmungen, Verkehrsbezeichnungen

Abschnitt I

Allgemeines

Honig ist der natursüße Stoff, der von Honigbienen erzeugt wird, indem die Bienen Nektar von Pflanzen oder Sekrete lebender Pflanzenteile oder sich auf den lebenden Pflanzenteilen befindende Exkrete von an Pflanzen saugenden Insekten aufnehmen, durch Kombination mit eigenen spezifischen Stoffen umwandeln, einlagern, dehydrieren und in den Waben des Bienenstocks speichern und reifen lassen.

Honig besteht im Wesentlichen aus verschiedenen Zuckerarten, insbesondere aus Fructose und Glucose, sowie aus organischen Säuren, Enzymen und beim Nektarsammeln aufgenommenen festen Partikeln. Die Farbe des Honigs reicht von nahezu farblos bis dunkelbraun. Er kann von flüssiger, dickflüssiger oder teilweise bis durchgehend kristalliner Beschaffenheit sein. Die Unterschiede in Geschmack und Aroma werden von der jeweiligen botanischen Herkunft bestimmt.

Abschnitt II

Honigarten

Nach Herkunft, Gewinnungsart, Angebotsform oder Zweckbestimmung werden folgende Honigarten unterschieden:

Verkehrsbezeichnung	Begriffsbestimmung
1. Blütenhonig oder Nektarhonig	vollständig oder überwiegend aus dem Nektar von Pflanzen stammender Honig
2. Honigtauhonig	Honig, der vollständig oder überwiegend aus auf lebenden Pflanzenteilen befindlichen Exkreten von an Pflanzen saugenden Insekten (Hemiptera) oder aus Sekreten lebender Pflanzenteile stammt
3. Wabenhonig oder Scheibenhonig	von Bienen in den gedeckelten, brutfreien Zellen der von ihnen frisch gebauten Honigwaben oder in Honigwaben aus feinen, ausschließlich aus Bienenwachs hergestellten gewaffelten Wachsblättern gespeicherter Honig, der in ganzen oder geteilten Waben gehandelt wird
4. Honig mit Wabenteilen oder Wabenstücke in Honig	Honig, der ein oder mehrere Stücke Wabenhonig enthält
5. Tropfhonig	durch Austropfen der entdeckelten, brutfreien Waben gewonnener Honig
6. Schleuderhonig	durch Schleudern der entdeckelten, brutfreien Waben gewonnener Honig
7. Presshonig	durch Pressen der brutfreien Waben ohne oder mit Erwärmung auf höchstens 45 Grad C gewonnener Honig
8. gefilterter Honig	Honig, der gewonnen wird, indem anorganische oder organische Fremdstoffe so entzogen werden, dass Pollen in erheblichem Maße entfernt werden
9. Backhonig	Honig, der für industrielle Zwecke oder als Zutat für andere Lebensmittel, die anschließend verarbeitet werden, geeignet ist

Anlage 2 (zu den §§ 2 und 4)

Anforderungen an die Beschaffenheit

Abschnitt I

Allgemeine Anforderungen

Honig dürfen keine anderen Stoffe als Honig zugefügt werden.

Honig muss, soweit möglich, frei von organischen und anorganischen honigfremden Stoffen sein. Honig dürfen jedoch keine honigeigenen Stoffe entzogen werden, soweit dies beim Entfernen von anorganischen oder

organischen honigfremden Stoffen nicht unvermeidbar ist. Abweichend davon dürfen gefiltertem Honig Pollen entzogen worden sein.
Honig darf keinen künstlich veränderten Säuregrad aufweisen. Honig darf mit Ausnahme von Backhonig keinen fremden Geschmack oder Geruch aufweisen, nicht in Gärung übergegangen oder gegoren sein oder so stark erhitzt worden sein, dass die Enzyme erheblich oder vollständig inaktiviert wurden.

Abschnitt II

Spezifische Anforderungen

1. Zuckergehalt
 - 1.1. Fructose- und Glucosegehalt (Summe)
 - a) Blütenhonig mindestens 60 g/100 g,
 - b) Honigtau- und Blütenhonig, allein oder in Mischung mit Blütenhonig mindestens 45 g/100 g,
 - 1.2. Saccharosegehalt
 - a) Im Allgemeinen höchstens 5 g/100 g,
 - b) Honig von Robinie (*Robinia pseudoacacia*), Luzerne (*Medicago sativa*), Banksia (*Banksia menziesii*), Süßklee (*Hedysarum*), Roter Eukalyptus (*Eucalyptus camadulensis*), Eucryphia (*Eucryphia lucida*), Eucryphia (*Eucryphia milliganii*), Citrus spp. höchstens 10 g/100 g,
 - c) Honig von Lavendel (*Lavandula* spp.), Borretsch (*Borago officinalis*) höchstens 15 g/100 g.
2. Wassergehalt
 - a) Im Allgemeinen höchstens 20%,
 - b) Honig von Heidekraut (*Calluna*) und Backhonig im Allgemeinen höchstens 23%,
 - c) Backhonig von Heidekraut (*Calluna*) höchstens 25%.
3. Gehalt an wasserunlöslichen Stoffen
 - a) Im Allgemeinen höchstens 0,1 g/100 g,
 - b) Presshonig höchstens 0,5 g/100 g.
4. Elektrische Leitfähigkeit
 - a) Honigarten im Allgemeinen und Mischungen dieser Honigarten höchstens 0,8 mS/cm,
 - b) Honigtau- und Kastanienhonig und Mischungen dieser Honigarten mindestens 0,8 mS/cm.

Den unter den Buchstaben a und b festgelegten Anforderungen müssen die nachfolgend genannten Honigarten sowie Mischungen mit diesen Honigarten nicht entsprechen:
Honige von Erdbeerbaum (*Arbutus unedo*), Glockenheide (*Erica*), Eukalyptus, Linden (*Tilia* spp.), Heidekraut (*Calluna vulgaris*), Leptospermum, Teebaum (*Melaleuca* spp.).
5. Gehalt an freien Säuren
 - a) Im Allgemeinen höchstens 50 Milliäquivalente Säure pro kg,
 - b) Backhonig höchstens 80 Milliäquivalente Säure pro kg.
6. Hydroxymethylfurfuralgehalt (HMF), bestimmt nach Behandlung und Mischung
 - a) Im Allgemeinen, mit Ausnahme von Backhonig höchstens 40 mg/kg (vorbehaltlich der Bestimmungen unter Nr. 7 Buchstabe b),
 - b) Honig mit angegebenem Ursprung in Regionen mit tropischem Klima und Mischungen solcher Honigarten untereinander höchstens 80 mg/kg.
7. Diastase-Zahl nach Schade, bestimmt nach Behandlung und Mischung
 - a) Im Allgemeinen mit Ausnahme von Backhonig mindestens 8,
 - b) Honigarten mit einem geringen natürlichen Enzymgehalt (z. B. Zitrus- und Zitrus-Enzymgehalt) und einem HMF-Gehalt von höchstens 15 mg/kg mindestens 3.

10. Gesamtballaststoffe

10.1. Prinzip der Methode

Das Probenmaterial wird mit hitzebeständiger α -Amylase behandelt, wodurch die Stärke verkleistert und teilweise gespalten wird. Durch Zugabe einer Protease wird Protein und anschließend durch Amyloglucosidase die restliche Stärke abgebaut.

Die löslichen Ballaststoffe werden mit Ethanol ausgefällt, der Niederschlag wird filtriert, gewaschen, getrocknet und gewogen.

Im Rückstand wird sodann in einer Probe das verbliebene Protein, in der Parallelprobe die Asche bestimmt. Danach erfolgt die Berechnung der Gesamtballaststoffe (GB).

Wichtigste Vorschriften nach AS § 35 LMBG

00.00-18

10.2. Durchführung

- Glasfiltertiegel (T) vorbereiten: bei 525 °C kurz ausheizen, erst im Trockenschrank, dann im Exsikkator abkühlen lassen, 1 g Celite einwiegen
- Einwaage ca. 0,5 g auf 0,1 mg genau in Inkubationsflasche
- 50 ml Pufferlösung (pH = 6,0) zugeben
- Für saure Produkte (pH < 5,8) ist der pH-Wert durch Zutropfen von NaOH auf 6,0 einzustellen
- 50 μ l α -Amylase zugeben, Flaschen abdecken (Alufolie) und 15 min (ab Siedebeginn) in kochendes Schüttelwasserbad stellen
- nach Abkühlen 10 ml NaOH zugeben; pH = $7,5 \pm 0,2$
- 50 μ l Protease zugeben, bei 60 °C (Schüttelwasserbad) 30 min inkubieren
- nach Abkühlen 10 ml HCl zugeben; pH = $4,5 \pm 0,2$
- 150 μ l Amyloglucosidase zugeben; bei 60 °C im Schüttelwasserbad 30 min inkubieren; währenddessen Ethanol (95%) auf 60 °C erwärmen
- durch Zugabe von 280 ml des erwärmten Alkohols lösliche Ballaststoffe ausfällen, 1 h absetzen lassen
- Niederschlag entsprechend der Bedienungsanleitung im "FIBERTEC E" filtrieren
- Rückstand waschen:
 - 3 * 20 ml Ethanol 78 %
 - 2 * 10 ml Ethanol 95 %
 - 3 * 10 ml Aceton
 - 2 * 10 ml Petrolbenzin (Siedeber. 40-60 °C)

- über Nacht bei 105 °C trocknen; Rückwaage 1 (T+GB)
- aus dem Rückstand eines Tiegels Stickstoff nach Kjeldahl bestimmen
- den Rückstand des zweiten Tiegels bei 525 °C veraschen (5 h),
nach Abkühlen in Trockenschrank und Exsikkator
Rückwaage 2: (T+A)

10.3. Berechnung

$$GB = \frac{(T+GB) - (T+A)}{EW} * 100 - P \quad [\% \text{ bzw. g/100 g}]$$

(T+GB) = Rückwaage 1 (nach Trocknen bei 105 °C) [g]

(T+A) = Rückwaage 2 (nach Veraschen) [g]

P = im Rückstand gefundenes Protein [%]

EW = Einwaage [g]

(T = Tiegel, A = Asche)

Wenn erforderlich, erhaltenen Wert noch auf Frischmasse umrechnen.

- Ethanol 78%: 4 Teile Ethanol 95% und 1 Teil Wasser mischen
- NaOH (0.275 mol/l): 11,0 g NaOH in dest. Wasser lösen und auf 1 l auffüllen
- HCl (0,350 mol/l): 350 ml 1N HCl (aus Ampulle) auf 1 l Wasser auffüllen
- Puffer pH = 6,0: 1,786 g Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 * 2 \text{ H}_2\text{O}$) + 7,989 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) auf 1 l Wasser; pH-Wert kontrollieren (potentiometrisch); einstellen mit H_3PO_4 bzw. NaOH
- Enzyme: als "Kit" von der Fa. Merck

11. Gesamtfett nach Soxhlet(Etherextrakt)

11.1. Prinzip der Methode

Die Probe wird direkt (z.B. für Fette) oder nach HCl-Aufschluss (z.B. für Fleisch- und Getreideprodukte) mit einem Lösungsmittel (Petrolether, Siedebereich 40-60 °C, Petroleumbenzin, Diethylether oder n-Hexan) mit dem Extraktionsgerät SOXTHERM 2000 extrahiert. Die extrahierbaren Bestandteile der Probe werden nach Abdestillieren des Lösungsmittels und anschließender Trocknung gewogen.

Wichtigste Vorschriften

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG:

- 06.00-6
- 13.05-3
- 17.00-4
- 44.00-4

11.2. Durchführung

11.2.1. HCl-Aufschluss

- Einwaage je nach Fettgehalt: 3 - 10 g auf 1 mg genau in 600-ml-Becherglas
- mit 160 ml 4 N HCL versetzen, Siedesteine zugeben, mit Uhrglas abdecken, 20 min (Brot),
- 30 min (Käse) bzw. 60 min (Fleisch) kochen
- mit ca. 150 ml heißem Wasser versetzen, Uhrglas abspülen
- durch angefeuchtetes Faltenfilter (hart) zügig filtrieren;
- mit heißem Wasser säurefrei waschen (Waschwasser mit pH-Papier prüfen)
- Filter zusammenfallen und im Becherglas bei 95 ± 2 °C 4 - 6 h
- trocknen (lt. LMBG 103 ± 2 °C; aber: Verharzung möglich!)

11.2.2. Extraktion

- Lösungsmittelbecher mit Siedestein (!) bei 103 ± 2 °C vortrocknen (1 h), nach Abkühlung im Exsikkator (ca. 30 min) wiegen
- getrockneten Filter in Extraktionshülse stecken oder in Filterpapier einwickeln, mit Quarzwatte abdecken, etwaige Fettrückstände im Becherglas mit lösungsmittelgetränktem Zellstoff aufnehmen und zur Hülse geben
- Extraktionshülsenhafter von unten über Extraktionshülse schieben, bis er mit der Oberkante der Hülse bündig ist
- Hülse in den Lösungsmittelbecher einsetzen und 140 ml Petrolether dazugeben
- den Becher in das Extraktionsgerät (Soxtherm) einsetzen

- Gerät einschalten, Wasser- und Stickstoffzufuhr öffnen, "ON/OFF" drücken
- Schlüsselschalter muss auf Sicherheitstemperatur von 200 °C eingestellt sein
- Taste "1" drücken und Nummer des Programms eingeben
- angegebene Zeit bestätigen; es wird die voraussichtliche Programmdauer angezeigt
- nach Ablauf des Programms Becher bei 103 °C 1 Stunde im Trockenschrank trocknen, im Exsikkator ca. 30 min abkühlen lassen und auf 1 mg genau zurückwiegen

11.3. Berechnung

$$\text{Fett [g/100 g]} = \frac{\text{K+Fett) - K}}{\text{EW}} \cdot 100$$

$$\begin{aligned} \text{(K+Fett)} &= \text{Kolben + Fett [g]} \\ \text{K} &= \text{Kolben leer [g]} \\ \text{EW} &= \text{Einwaage [g]} \end{aligned}$$

11.4. Wiederholbarkeit

Fettgehalt	%		mg/kg
<15 %, z.B. Toastbrot	± 0,2	bzw.	2
>15 %, z.B. Fleischprodukte	± 0,5	bzw.	5
>50 %, z.B. Halbfettmargarine	± 0,6	bzw. 6	Margarine ± 0,19 bzw. 1,9

11.5. Vergleichbarkeit

Fettgehalt	%		mg/kg
<15 %, z.B. Toastbrot	± 0,44	bzw.	4,4
>15 %, z.B. Fleischprodukte	± 0,7	bzw.	7
>50 %, z.B. Halbfettmargarine	± 0,8	bzw. 8	Margarine ± 0,36 bzw. 3,6

11.6. Andere Verfahren

- Gerber: Milch

- Röse-Gottlieb sowie Weibull-Stoldt: Milch, Milchprodukte
- Schmidt-Bondzynski-Ratzlaff (Referenz): Käse
- Heißextraktion (Lipide): Ei, Eiprodukte

11.7. Schwerpunkte (Etherextraktbestimmung)

- ✓ Was sind Lipide (chemische Struktur, Einteilung, Beispiele)?
- ✓ Wozu vorherige Hydrolyse? Welche Methoden?
- ✓ Welche Stoffe werden bei der Analyse erfasst?
- ✓ Was passiert, wenn bei der Soxhlet-Extraktion Probe oder Lösungsmittel noch Wasser enthalten?
- ✓ Einfluss von Trocknungstemperatur und -zeit auf das Ergebnis
- ✓ Weitere Methoden zur quantitativen Bestimmung
- ✓ Methoden zur Charakterisierung von Fetten

12. Enzymatische Bestimmung von Cholesterin in Lebensmitteln

12.1. Prinzip der Methode

Es erfolgt eine Verseifung der Cholesterinester mit methanolischer KOH. Cholesterin wird von Cholesterin-Oxidase zu Cholestenon oxidiert (1). Das bei dieser Reaktion entstehende Wasser-stoffperoxid oxidiert Methanol in Gegenwart von Katalase zu Formaldehyd (2). Formaldehyd bildet mit Acetylaceton in Gegenwart von NH_4^+ -Ionen einen gelben Lutidinfarbstoff (3).

(1) $\text{Cholesterin} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Chol.Oxidase}} \text{Cholestenon} + \text{H}_2\text{O}_2$

(2) $\text{Methanol} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Katalase}} \text{Formaldehyd} + 2 \text{H}_2\text{O}$

(3) $\text{Formaldehyd} + \text{NH}_4^+ + 2 \text{Acetylaceton} \rightarrow \text{Lutidinfarbstoff} + 3 \text{H}_2\text{O}$

Die Konzentration des entstehenden Lutidinfarbstoffs ist der Menge an Cholesterin äquivalent und wird aufgrund seiner Absorption im sichtbaren Bereich bei 405 nm photometrisch gemessen.

12.2. Durchführung

Probenvorbereitung

Zur Analyse wird gefriergetrocknetes Eigelb und Eiklar (mit 0,5 mm Sieb vermahlen) eingesetzt.

- 250 mg Probe in einen 50 ml-Messkolben auf 1 mg genau einwiegen
- 1 g Seesand (die Volumenverdrängung von 0,4 ml ist bei der Berechnung zu berücksichtigen) hinzufügen
- 20 min mit 20 ml methanolischer KOH (1 mol/l) und 10 ml Isopropanol erhitzen (70 °C)
- trübe Lösung abkühlen lassen
- bei Raumtemperatur Messkolben mit Isopropanol bis zur Marke auffüllen und mischen
- durch ein Faltenfilter filtrieren
- klare Lösung zum Test einsetzen

Pipettierschema (alle Volumenangaben in µl) In Glasröhrchen pipettieren	Probe (A)	Proben-Leerwert (B)
Lösung 4	-	5000
Probelösung	-	400
Summe	-	5400



Aus dem Reagenzglas des Leerwertes abpipettieren	2500	2900 (Rest)
Lösung 3 (Enzym)	20	-

Gut mischen, Leerwerte und Probe verschließen und 45 min bei 37-40 °C inkubieren, nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur Extinktionen nacheinander gegen Luft messen, Extinktion des Leerwertes von der Extinktion der Probe abziehen (ΔE)

- Lösung 1: Ammoniumphosphatpuffer pH = 7,0; Methanol 2,6 mol/l, Katalase (220000 U)
Lösung 2: Acetylaceton 0,05 mol/l, Methanol 0,3 mol/l
Lösung 3: Cholesterin-Oxidase ca. 12 U
Lösung 4: 3 Teile von Lösung 1 und 2 Teile von Lösung 2 mischen, mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen lassen

12.3. Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = (V * MG) / (\epsilon * d * v * 1000) * \Delta E \text{ (g/l)}$$

V... Testvolumen [ml]

v... Probevolumen [ml]

MG... Molekulargewicht [g/mol]

d... Schichtdicke

ϵ ... Extinktionskoeffizient des Lutidinfarbstoff bei 405 nm ($7,4 \text{ l} * \text{mmol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$)

$c = 0,711 * \Delta E$ [g Cholesterin / l Probelösung]

Berechnung des Steringehaltes im Ei [mg/100 g] berechnet als Cholesterin:

Steringehalt [mg/100 g Trockenei] = Steringehalt der Probelösung [g/l] * 100 * 49,6/EW
(EW: Einwaage der Probe in Gramm)

Steringehalt [mg/100 g Frischei] = Steringehalt [mg/100 g Trockenei] * Gefrier-TS [g/g]

12.4. Schwerpunkte

- Welches Prinzip liegt der Methode zugrunde (Erklärung anhand der Strukturformeln)?
- Bedeutung, Funktion und Stoffwechsel von Cholesterol
- Grundlagen der photometrischen Messung

13. Gesamt- und Reinprotein

13.1. Gesamtprotein

13.1.1. Prinzip der Methode

Die Probe wird mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz eines Katalysatorgemisches aufgeschlossen, aus dem entstandenen Ammoniumsulfat wird Ammoniak freigesetzt, durch Wasserdampfdestillation in eine borsäurehaltige Vorlage übergetrieben und durch Titration mit Salzsäure bestimmt.

Wichtigste Vorschriften nach AS § 35 LMBG

01.00-10, 05.00-15, 06.00-7, 17.00-15

13.1.2. Chemikalien

- Borsäurelösung (0,5 %ig)
ca. 10 g Borsäure in 2 l H₂O lösen u. 10 ml Tashiro-Lösung zugeben
mit wenigen Tropfen verd. NaOH auf Farbumschlag („Schlamm“) einstellen
- Natronlauge (32 %ig, Roth)
- N/20 HCl: Ampulle für 1 l N/10 HCl auf 2 l genau auffüllen (Maßkolben)
- Katalysator (Tablette oder Pulver): 1,8 % CuSO₄, 2,8 % TiO₂, 95,4 % Na₂SO₄

13.1.3. Durchführung

Aufschluss (Abzug, Handschuhe, Schutzbrille)

- Einwaage der Frischsubstanz in Kjeldahl-Kolben (auf 0,1 mg)
Milch: 2 ml
(Frischei, Fleisch und -produkte: 0,3 -1 g)
+ 5 ml Wasserstoffperoxid (H₂O₂),
+ 5 ml konz. Schwefelsäure
+ Katalysator (kleine Tablette oder ca. 0,5 g)
ggf. Siedesteine zugeben
- Probe gründlich schwenken
- Probe erhitzen, bis Lösung klar ist (weitere ca. 30 min nacherhitzen)
- Probe abkühlen lassen

Destillation und Titration

- Zugabe der gleichen Menge Wasser in den abgekühlten Kjeldahl-Kolben (Vorsicht!!!)
- einige Tropfen Tashiro-Indikator zugeben
- Destillationsvorlage mit Borsäurelösung bereitstellen
(Auslauf der Destillationsapparatur muß in die Vorlage eintauchen)

- Kolben an Destillationsapparatur anhängen, 32 %ige Natronlauge zugeben → Farbumschlag tritt ein
- mit Wasser nachspülen (Apparatur muß dicht sein!)
- destillieren, bis in der Vorlage ca. 150 ml erreicht sind (etwa 10 min)
- Kühlerauslauf abspülen
- mit N/20 HCl bis zum Farbumschlag nach grau titrieren

13.1.4. Berechnung

$$\text{Kjeldahl-Stickstoff: N [mg/g]} = \frac{V * F - B}{EW}$$

(1 mg/g = 1 g/kg = 0,1 %)

V = Verbrauch an N/20 HCl [ml]

F = Äquivalenzfaktor für N/20 HCl = 0,7004 [mg/ml],

d.h.: 1 ml N/20 HCl enthält 1/20 mmol HCl, dies entspricht 1/20 mmol N = 0,7004 mg N

B = Blindwert [mg N] (0,04)

EW = Einwaage [g]

Gesamtprotein: Multiplikation mit N-Faktor für:

<u>allgemein</u>	6,25
<u>außer: Milch</u>	6,38
Kasein	6,45
Gelatine	5,55

$$\text{Protein [g/100 g]} = N * \text{N-Faktor} : 10$$

Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

r = 0,80 g/100 g R = 1,76 g/100 g Gesamtprotein (für Ei)

Die **Wiederholbarkeit** „r“ ist derjenige Wert, unterhalb dessen man die absolute **Differenz zwischen zwei** einzelnen **Prüfergebnissen**, die man mit **demselben Verfahren** an **identischem Prüfmaterial** unter **denselben Bedingungen** (derselbe Bearbeiter, dasselbe Gerät, dasselbe Labor, kurze Zeitspanne) erhalten hat, mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit erwarten darf; wenn nichts anderes angegeben ist, so ist diese Wahrscheinlichkeit 95%.

Die **Vergleichbarkeit** „R“ ist derjenige Wert, unterhalb dessen man die absolute **Differenz zwischen zwei** einzelnen **Prüfergebnissen**, die man an **identischem Material**, aber unter **verschiedenen Bedingungen** (verschiedene Bearbeiter, verschiedene Geräte, verschiedene Labors und/oder zu verschiedenen Zeiten) gewonnen hat, mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit erwarten darf; wenn nichts anderes angegeben ist, so ist diese Wahrscheinlichkeit 95% (nach Entwurf DIN ISO 5725).

13.2. Reinprotein (ZnSO₄-Fällung)

13.2.1. Prinzip der Methode

Eiweiße gerinnen z.B. in sauren Lösungen oder in Anwesenheit von Schwermetallionen, während Nicht-Eiweiß-Verbindungen (NPN: Amine, Amide, freie Aminosäuren u. a.) in Lösung bleiben.

Reinprotein wird deshalb durch ein spezifisches Fällungsmittel (z. B. ZnSO₄, Trichloressigsäure, Sulfosalicylsäure, Pikrinsäure, Cu(OH)₂, Phosphorwolframsäure, Gerbsäuren, Alaun u.a.) gefällt und durch Zentrifugation und/oder Filtration von der löslichen NPN-Fraktion isoliert. Anschließend wird der N-Gehalt entweder im ausgefällten Rückstand (enthält das Reineiweiß) oder im Filtrat (enthält die NPN-Verbindungen) nach Kjeldahl quantifiziert.

Wichtigste Vorschriften nach § 35 LMBG und LUFA

LMBG L 07.00-41 (Nichtprotein-Stickstoffsubstanz in Fleischerzeugnissen);

Methodenbuch III LUFA 4.4.1-4.4.2 (Reineiweiß)

Methodenbuch VI LUFA C 30.5 (Reineiweiß in Milch und Milchprodukten);

13.2.2. Durchführung

- 2 ml flüssige homogene bzw. 250 mg lufttrockene Probe in ein Becherglas pipettieren bzw. einwiegen
- Probe mit dest. Wasser auf ca. 10 ml ergänzen
- Lösen der Proteine in der Probe durch langsames Zugabe von 2 ml 1 %iger (bei Molke 4 %iger) Natronlauge
- Anschließende Fällung der Proteine mittels 1 ml 30 %iger Zinksulfatlösung
- (Lösung tropfenweise hinzufügen + gleichzeitig Umrühren)
- Nach 10 Minuten wird quantitativ durch einen angefeuchteten Rundfilter filtriert
 - Das Becherglas ist dabei mehrere Male mit dest. Wasser unter Verwendung eines Gummiwischers zu spülen, wobei gleichzeitig der Niederschlag im Filter nachgewaschen wird
- Überführen des Filterpapiers mit dem Niederschlag in Kjeldahl-Kolben
- Aufschluß und N-Destillation (siehe → Gesamt-N-Bestimmung).

13.2.3. Berechnung

$$\text{Kjeldahl-Stickstoff: N [mg/g FM]} = \frac{V \cdot F - B}{EW}$$

- V = Verbrauch an N/20 HCl [ml]
F = Äquivalenzfaktor für N/20 HCl = 0,7004 [mg N/ml HCl]
B = Blindwert [mg N] (Ges.-N=0,04; fällb. N=0,14; lösl.N=0,11)
EW = Einwaage [g] bzw. [ml]

Reinprotein [g/kg bzw. g/l Probe] = N_[mg/g] * N-Faktor_[6,38]

NPN-Verbindungen [in % der FM] = Gesamtprotein - Reinprotein

Richtwerte für Milch:

Gesamtprotein	3,5 g/100 ml
Gesamt-N	550 mg/100 ml

davon:

Harnstoff	14 mg/100 ml bzw.	52,2 % des NPN
freie AS	4	15,0
Kreatin/Kreatinin	3,8	14,2
Peptide	3	11,1
Ammoniumsalze	0,9	3,4
Harnsäure	0,7	2,6
Hippursäure	0,4	1,5
ges. NPN¹	26,8	100
(4,9 % des RP)		

¹) Zuzüglich Spuren an Purin-, Pyrimidinderivaten, Lactoflavin u.a. N-haltige Nicht-Protein-Verbindungen

Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

r = 1,0 g/100 g R = 2,0 g/100 g Reinprotein (für Milch)

Literatur

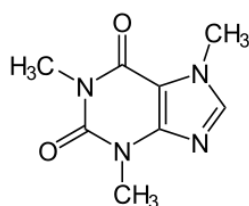
- MATISSEK; R., SCHNEPEL, F.-M., STEINER Gabriele: Lebensmittelanalytik. Springer-Verlag, 2.Aufl.1992

14. Coffein, Theophyllin, Theobromin

14.1. Allgemeines

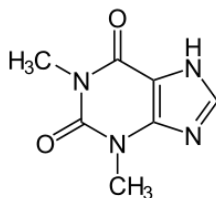
14.1.1. Coffein

Coffein bzw. 1,3,7-Trimethylxanthin ist aufgrund seiner pharmakologischen und physiologischen Wirkung das wichtigste alkaloidhaltige Genussmittel. Es kommt vor allem in Kaffee (Arabica: 0,9- 1,4 % bzw. Robusta: 1,5-2,6 %) und Tee (2,5 – 5,5 % der TM) vor, sowie in geringen Mengen in Kakao (~ 0,2 %) und der Colanuss (~ 2 %). Infolge der anregenden Wirkung auf das ZNS wird Coffein zahlreichen Erfrischungsgetränken zugesetzt.



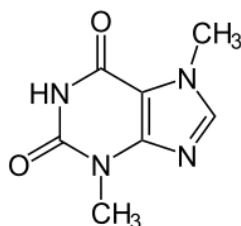
14.1.2. Theophyllin

Das Purinalkaloid 1,3-Dimethylxanthin kommt hauptsächlich in den Blättern des Teestrauchs zu etwa 0,01 % vor, aber auch in Spuren von Kaffee. Während Coffein vorwiegend anregend auf das ZNS und verengend auf Gehirngefäße wirkt, hat Theophyllin zusätzlich eine deutlich bronchienerweiternde, herzstimulierende und diuretische Wirkung.



14.1.3. Theobromin

3,7-Dimethylxanthin ist das charakteristischste Alkaloid der Kakaobohne und mit einer relativ großen Menge von 2 % physiologisch bedeutend. Es wirkt ebenso wie Coffein, nur weniger ausgeprägt. Des Weiteren ist Theophyllin in geringen Mengen in Tee (0,07 – 0,17 %) und im Kaffee vertreten.



14.2. Rechtliche Regelungen

14.2.1. Cola

In § 1 der Verordnung über koffeinhaltige Erfrischungsgetränke wird gefordert, dass bei Getränken, die Coffein enthalten, in klarer und unzweideutiger Weise auf dessen Gehalt hingewiesen wird.

14.2.2. Kaffee

In der Verordnung über Kaffee, Kaffee- und Zichorien-Extrakte vom 15. November 2001 ergibt sich aus § 2 (3) 1a), dass das Wort „entkoffeiniert“ nur für Röstkaffee, der höchstens ein Gramm Coffein in einem Kilogramm Kaffeetrockenmasse enthält, verwendet werden darf.

14.2.3. Tee

In der Neufassung der Leitsätze für Tee und teeähnliche Erzeugnisse, deren Extrakte und Zubereitungen vom 09. April 1999 ist u. a. ein Mindestgehalt von 1,5 % Coffein in der Trockenmasse als wichtiges Beschaffenheitsmerkmal (C. 7) aufgeführt. Auf eine Entkoffeinierung des Tee-Extraktes darf nur hingewiesen werden, wenn die Trockenmasse nicht mehr als 1,2 % Coffein enthält.

14.3. Aufgabe

Ermitteln Sie in Doppelbestimmung die Gehalte von Coffein, Theophyllin und Theobromin in Cola, Kaffee und Tee.

14.3.1. Cola

Ermitteln Sie die Gehalte an den o. a. Alkaloiden in der Probe. Stimmen die Analysenergebnisse mit der Deklaration eines Colaherstellers (Gehalt an Coffein: 12 mg/100 ml = 120 mg/L) überein? Begründung! Was wäre die Konsequenz?

14.3.2. Kaffee

Ermitteln Sie die Gehalte an den o. a. Alkaloiden in der Probe und überprüfen Sie, ob bei der vorliegenden Probe die Bezeichnung "Röstkaffee, entkoffeiniert" zutreffend ist. Begründung!

14.3.3. Tee

Ermitteln Sie die Gehalte an den o. a. Alkaloiden in der Probe und prüfen Sie, ob es sich bei der vorliegenden Probe um Tee oder entkoffeinierten Tee-Extrakt handelt. Begründung!

14.4. Prinzip der Methode

Die Alkaloide werden aus den zu untersuchenden Proben im Alkalischen mit Essigsäureethylester durch Flüssig-Flüssig-Extraktion extrahiert und mittels HPLC an einer RP-C18-Phase mit UV-Detektor quantifiziert.

14.5. Durchführung

Chemikalien:

- Methanol
- Essigsäureethylester
- 0,3 N NaOH
- 0,01 M Natriumacetatlösung, mit 10-%iger Essigsäure auf pH 5,60 eingestellt

Geräte zur Extraktion:

- Messzylinder 50 mL
- Ultraschallbad
- Schütteltrichter 250 mL
- Birnenkolben 150 mL
- Rotationsverdampfer
- div. Pipetten
- Bechergläser

HPLC-Gerät:

- CBM-20A Prominence Communication Bus Modul
- Pumpe LC-10AT VP
- Autosampler SIL-10A
- UV-Detektor UV-VIS VP

Standardlösungen für Kalibrierung:

Die Standardlösungen für die Kalibrierung stehen in injektionsfähigem Zustand zur Verfügung. Ihre Konzentrationen betragen:

S1	12,5 µg/25 mL	mg/L
S2	37,5 µg/25 mL	mg/L
S3	87,5 µg/25 mL	mg/L
S4	125 µg/25 mL	mg/L

Rechnen Sie die Konzentrationen in mg/L um und verwenden diese für die weitergehenden Berechnungen.

Extraktion:

- Einwaage Kaffee: 31 g/ 500 mL H₂O, filtriert
- Trockenmasse Schwarztee: 1,75 g/ 150 mL H₂O, filtriert

50,0 ml des jeweiligen (entgasten) Getränkes werden durch Zugabe von 0,3 N NaOH auf einen pH-Wert von 9-11 (schon vorbereitet) gebracht. Anschließend werden die Alkaloide 3x mit jeweils 20 ml Essigsäureethylester in einem 250-mL-Schütteltrichter extrahiert. Nach der Extraktion kann mit Hilfe von einigen Tropfen Methanol die Phasentrennung erleichtert werden. Die vereinigten Extrakte werden in einem 150-mL-Birnenkolben am Rotationsverdampfer bis fast zur Trockene eingeeengt. Weiterführend wird der Rückstand in 5,0 mL Eluent aufgenommen. Von den Probenlösungen wird eine geeignete Verdünnung (mit Eluenten) von 1:200 in einem 2-mL-Reaktionsgefäß hergestellt. Im Anschluss kann mittels HPLC Coffein, Theophyllin und Theobromin in den Ausgangsstoffen quantifiziert werden.

HPLC-Bedingungen:

HPLC-Säule:	150x4,6 mm, RP-C18, 5 µm Supelcosil (Supelco)
Eluent:	0,01 M Natriumacetatlösung/Methanol (75/25; v/v)
Injektionsvolumen:	50 µl
Fluss:	0,4 mL/min
Detektor:	UV-Detektor, 280 nm

14.6. Auswertung

Die Identifizierung und Quantifizierung der Alkaloide erfolgt mit Hilfe der Standardlösungen und wird über die Peakflächen nach der Methode des externen Standards anhand der verschiedenen Standardkonzentrationen und der daraus resultierenden Geradengleichungen vorgenommen. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in mg/L Getränk bzw. in % der Trockenmasse Probenmaterial.

Angabe der Ergebnisse:

Kalibrierung: Peakfläche gegen Konzentration c [mg/L]

Cola in mg/L, Schwarztee und Kaffee in mg/L und % der Trockenmasse

14.7. Vorbereitung auf den Versuch

Folgende Themenkomplexe sollten vor Versuchsbeginn erarbeitet werden:

- Alkaloide
- HPLC (Prinzip, Einsatz etc.)
- Umkehrphasenchromatographie
- UV-Detektion

Literatur

- Baltes, W. „Lebensmittelchemie“ 6. Auflage
- Franzke, C. „Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie“ 3. Auflage
- Klein, Rabe, Weiss „Lebensmittelrecht“ Textsammlung Band 1, 4

Verordnung über koffeinhaltige Erfrischungsgetränke

vom 24. Juni 1938

(RGBl. I S. 691), geändert durch Art. 33 der Verordnung vom 16. 5. 1975 (BGBl. I S. 1281) und Art. 2 der 2. ÄndVO der LMKV und anderer lebensmittelrechtlicher Verordnungen vom 13. 1. 2004 (BGBl. I S. 67)*)

Aufgrund des § 5 Nr. 5 und des § 20 des Lebensmittelgesetzes in der Fassung vom 17. Januar 1936 (Reichsgesetzbl. I S. 17) wird verordnet:

§ 1

(1) Werden Limonaden oder limonadenähnliche Erfrischungsgetränke, die Koffein enthalten, oder gebrauchsfertige koffeinhaltige Zubereitungen zur Herstellung solcher Getränke angeboten, zum Verkaufe vorrätig gehalten, feilgehalten, verkauft oder sonst in den Verkehr gebracht, so müssen sie eine Bezeichnung tragen, die in klarer und unzweideutiger Weise auf den Koffeingehalt hinweist. Auch die im gewerblichen Verkehr verwendeten Aufmachungen sowie alle der geschäftlichen Werbung dienenden Angaben dürfen keinen Zweifel über den Koffeingehalt zulassen.

(2) Alle Bezeichnungen, Angaben und Aufmachungen, die den Vorschriften des Abs. 1 nicht entsprechen, sind irreführend im Sinne des § 4 Nr. 3 des Lebensmittelgesetzes.

(3) Absatz 1 Satz 1 gilt nicht für Erzeugnisse, die nach den Vorschriften der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung zu kennzeichnen sind.

§ 1a

Nach § 52 Abs. 1 Nr. 11 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes vom 15. August 1974 (Bundesgesetzbl. I S. 1945) wird bestraft, wer entgegen § 1 Erzeugnisse gewerbsmäßig in den Verkehr bringt. Wer eine in Satz 1 bezeichnete Handlung fahrlässig begeht, handelt nach § 53 Abs. 1 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes ordnungswidrig.

§ 2

Diese Verordnung tritt am 1. Oktober 1938 in Kraft.

*) Mit dieser Verordnung wird die Richtlinie 2002/67/EG der Kommission vom 18. Juli 2002 über die Etikettierung von chininhaltigen und von koffeinhaltigen Lebensmitteln (ABl. EG Nr. L 191 S. 20) in deutsches Recht umgesetzt.

Verordnung über Kaffee, Kaffee- und Zichorien-Extrakte*)

Vom 15. November 2001

(BGBl. I S. 3107), geändert durch Art. 3 der VO zur Änderung zusatzstoffrechtlicher und anderer lebensmittelrechtlicher Verordnungen vom 20. 12. 2002 (BGBl. I S. 4695**) und Art. 10 der VO zur Änd. lebensmittelrechtlicher und tabakrechtlicher Bestimmungen vom 22. 2. 2006 (BGBl. I S. 444)

Das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft verordnet

- auf Grund des § 19 Abs. 1 Nr. 1, 2 Buchstabe b und Nr. 4 Buchstabe a, b und c des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 9. September 1997 (BGBl. I S. 2296) sowie in Verbindung mit Artikel 56 Abs. 1 des Zuständigkeitsanpassungs-Gesetzes vom 18. März 1975 (BGBl. I S. 705) und den Organisationserlassen vom 27. Oktober 1998 (BGBl. I S. 3228) und vom 22. Januar 2001 (BGBl. I S. 127) im Einvernehmen mit dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie sowie
- auf Grund des § 44 Abs. 1 Nr. 2 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes in Verbindung mit Artikel 56 Abs. 1 des Zuständigkeitsanpassungs-Gesetzes vom 18. März 1975 und dem Organisationserlass vom 22. Januar 2001:

§ 1 Anwendungsbereich

- (1) Die in der Anlage aufgeführten Erzeugnisse unterliegen dieser Verordnung, soweit sie dazu bestimmt sind, als Lebensmittel gewerbsmäßig in den Verkehr gebracht zu werden.
- (2) Diese Verordnung gilt nicht für „Café torrefacto soluble“.

§ 2 Kennzeichnung

- (1) Für die in der Anlage aufgeführten Erzeugnisse sind die dort genannten Bezeichnungen Verkehrsbezeichnungen im Sinne der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung.
- (2) Die Angabe „konzentriert“ darf für die Kennzeichnung von Kaffee-Extrakten und Zichorien-Extrakten nur bei

*) Mit dieser Verordnung werden Bestimmungen der Richtlinie 1999/4/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Februar 1999 über Kaffee- und Zichorien-Extrakte (ABl. EG Nr. L 66 S. 26) in deutsches Recht umgesetzt.

**) Mit dieser Verordnung werden die Richtlinien

- 2001/5/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. Februar 2001 zur Änderung der Richtlinie 95/2/EG über andere Lebensmittelzusatzstoffe als Farbstoffe und Süßungsmittel (ABl. EG Nr. L 55 S. 59),
 - 2001/22/EG der Kommission vom 8. März 2001 zur Festlegung von Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Kontrolle auf die Einhaltung der Höchstgehalte für Blei, Cadmium, Quecksilber und 3-MCPD in Lebensmitteln (ABl. EG Nr. L 77 S. 14, Nr. L 325 S. 34),
 - 2001/30/EG der Kommission vom 2. Mai 2001 zur Änderung der Richtlinie 96/77/EG zur Festlegung spezifischer Reinheitskriterien für andere Lebensmittelzusatzstoffe als Farbstoffe und Süßungsmittel (ABl. EG Nr. L 146 S. 1),
 - 2001/50/EG der Kommission vom 3. Juli 2001 zur Änderung der Richtlinie 95/45/EG zur Festlegung spezifischer Reinheitskriterien für Lebensmittelfarbstoffe (ABl. EG Nr. L 190 S. 14),
 - 2001/52/EG der Kommission vom 3. Juli 2001 zur Änderung der Richtlinie 95/31/EG zur Festlegung spezifischer Reinheitskriterien für Süßungsmittel, die in Lebensmittel verwendet werden dürfen (ABl. EG Nr. L 190 S. 18), und
 - 2001/54/EG der Kommission vom 11. Juli 2001 zur Aufhebung der Richtlinie 79/1066/EWG zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden zur Überwachung der Zusammensetzung von Kaffee-Extrakten und Zichorien-Extrakten (ABl. EG Nr. L 191 S. 42)
- in deutsches Recht umgesetzt.

1. flüssigem Kaffee-Extrakt, der mehr als 250 Gramm Kaffee-Extrakttrockenmasse,
2. flüssigem Zichorien-Extrakt, der mehr als 450 Gramm Zichorien-Extrakttrockenmasse

in einem Kilogramm enthält, verwendet werden. Die Angabe nach Satz 1 ist in Verbindung mit der Verkehrsbezeichnung anzugeben.

(3) In der Anlage aufgeführte Erzeugnisse dürfen gewerbsmäßig nur in den Verkehr gebracht werden, wenn zusätzlich zu den nach der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung vorgeschriebenen Angaben gemäß Absatz 4 Satz 1 Nr.1 und Satz 2 angegeben sind:

1. das Wort „entkoffeiniert“ bei
 - a) Rohkaffee und Röstkaffee, der höchstens ein Gramm Koffein in einem Kilogramm Kaffeetrockenmasse,
 - b) festem, pastenförmigem und flüssigem Kaffee-Extrakt, der höchstens drei Gramm Koffein in einem Kilogramm Kaffee-Extrakttrockenmasse enthält,
2. der Mindestgehalt an Kaffee-Extrakttrockenmasse in Gewichtshundertteilen bei pastenförmigem und flüssigem Kaffee-Extrakt,
3. der Mindestgehalt an Zichorien-Extrakttrockenmasse in Gewichtshundertteilen bei pastenförmigem und flüssigem Zichorien-Extrakt,
4. das Wort „kandiert“ bei Röstkaffee, der mit Zuckerarten oder Honig überzogen ist,
5. die Wörter „mit Zucker geröstet“ bei flüssigem Kaffee-Extrakt und flüssigem Zichorien-Extrakt, wenn der Extrakt aus mit Zucker gebrannter Rohware gewonnen worden ist,
6. die Wörter „mit Zucker“, „mit Zuckerzusatz“ oder „mit Zucker haltbar gemacht“ bei flüssigem Kaffee-Extrakt und flüssigem Zichorien-Extrakt, wenn dem Extrakt Zucker nach dem Rösten der Rohware zugesetzt worden ist.

Werden andere Zuckerarten als Saccharose verwendet, gilt Satz 1 Nr. 5 und 6 entsprechend mit der Maßgabe, dass statt des Wortes „Zucker“ die betreffende Zuckerart anzugeben ist.

(4) Für die Art und Weise der Kennzeichnung nach Absatz 3 gilt

1. § 3 Abs. 3 Satz 1, 2 und 3 erster Halbsatz und
2. § 3 Abs. 4

der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung entsprechend. Die Angaben nach Absatz 3 Nr. 1, 5 und 6 sind im gleichen Sichtfeld wie die Verkehrsbezeichnung anzubringen.

§ 3 Verkehrsverbote

Gewerbsmäßig dürfen nicht in den Verkehr gebracht werden

1. Lebensmittel, die mit einer in der Anlage aufgeführten Bezeichnung versehen sind, ohne der betreffenden Begriffsbestimmung zu entsprechen,
2. Röstkaffee, der mehr als zwei Gramm kaffeefremde Bestandteile in einem Kilogramm enthält, wenn er nicht als unverlesener Kaffee oder Ausschusskaffee kenntlich gemacht ist,
3. Kaffee-Extrakte und Zichorien-Extrakte, die entgegen § 2 Abs. 2 Satz 1 mit der Angabe „konzentriert“ versehen sind.

Im Falle des Satzes 1 Nr. 2 bleiben der Gehalt an zugelassenen Zusatzstoffen in Röstkaffee und der Gehalt an Kandiermitteln in kandiertem Kaffee bei der Anwendung dieser Vorschrift unberücksichtigt.

§ 4 Analysemethoden

Die zur Bestimmung des freien Kohlenhydratgehaltes und des Gesamtkohlenhydratgehaltes von löslichen Kaffees verwendeten Analysenmethoden müssen hinsichtlich der im Anhang unter den Nummern 1 und 2 der Richtlinie 85/591/EWG des Rates vom 20. Dezember 1985 zur Einführung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren und Analysenmethoden für die Kontrolle von Lebensmitteln (ABl. EG Nr. L 372 S. 50) aufgeführten erforderlichen Kriterien getestet sein.

§ 5 Straftaten und Ordnungswidrigkeiten

(1) Nach § 59 Abs. 1 Nr. 21 Buchstabe a des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches wird bestraft, wer entgegen § 3 Satz 1 Lebensmittel in den Verkehr bringt.

(2) Wer eine in Absatz 1 bezeichnete Handlung fahrlässig begeht, handelt nach § 60 Abs. 1 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches ordnungswidrig.

(3) Ordnungswidrig im Sinne des § 60 Abs. 2 Nr. 26 Buchstabe a des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches handelt, wer vorsätzlich oder fahrlässig entgegen § 2 Abs. 3 Satz 1, auch in Verbindung mit Satz 2, ein Erzeugnis in den Verkehr bringt.

§ 6 Übergangsregelung

Bis zum 31. Dezember 2001 dürfen Erzeugnisse nach den bis zum Ablauf des 23. November 2001 geltenden Vorschriften hergestellt und gekennzeichnet werden. Nach Satz 1 hergestellte und gekennzeichnete Erzeugnisse dürfen bis zum Abbau der Vorräte in den Verkehr gebracht werden.

§ 7 Änderung der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung

In § 1 Abs. 3 der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 15. Dezember 1999 (BGBl. I S. 2464), die durch Artikel 3 der Verordnung vom 8. Dezember 2000 (BGBl. I S. 1686) geändert worden ist, wird die Nummer 2 gestrichen.

§ 8 Inkrafttreten, Außerkrafttreten

(1) Die Verordnung tritt am Tage nach der Verkündung in Kraft.

(2) Mit dem Inkrafttreten dieser Verordnung tritt die Kaffeeverordnung vom 12. Februar 1981 (BGBl. I S. 225), zuletzt geändert durch Artikel 13 der Verordnung vom 29. Januar 1998 (BGBl. I S. 230), außer Kraft.

Der Bundesrat hat zugestimmt.

Anlage
(zu § 1 und § 2)**Bezeichnungen und Begriffsbestimmungen**

1. a) Rohkaffee:
der von der Frucht- und Samenschale befreite ungeröstete Samen von Pflanzen der Gattung Coffea;
- b) Röstkaffee, Kaffee:
gerösteter Rohkaffee, ungemahlen oder gemahlen, mit einem Wassergehalt von höchstens 50 Gramm in einem Kilogramm.
2. a) Kaffee-Extrakt, löslicher Kaffee-Extrakt, löslicher Kaffee, Instant-Kaffee:
konzentriertes Erzeugnis, das mindestens 950 Gramm Kaffee-Extrakttrockenmasse in einem Kilogramm enthält;
- b) Kaffee-Extrakt in Pastenform, Kaffee-Extrakt-Paste:
konzentriertes pastenförmiges Erzeugnis, das 700 bis 850 Gramm Kaffee-Extrakttrockenmasse in einem Kilogramm enthält;
- c) flüssiger Kaffee-Extrakt, Kaffee-Extrakt in flüssiger Form:
konzentriertes flüssiges Erzeugnis, das 150 bis 550 Gramm Kaffee-Extrakttrockenmasse in einem Kilogramm enthält; es darf außerdem bis zu 120 Gramm ungebrannte oder gebrannte Zuckerarten in einem Kilogramm enthalten.

Diese Erzeugnisse werden durch Extraktion von geröstetem Kaffee unter ausschließlicher Verwendung von Wasser als Extraktionsmittel gewonnen und durch den Entzug von Wasser konzentriert. Neben unlöslichen Stoffen, die technisch nicht zu vermeiden sind, und aus dem Kaffee stammenden unlöslichen Ölen dürfen sie nur die löslichen und aromatischen Bestandteile des Kaffees enthalten.

3. a) Zichorien-Extrakt, lösliche Zichorie, Instant-Zichorie:
konzentriertes Erzeugnis, das mindestens 950 Gramm Zichorien-Extrakttrockenmasse in einem Kilogramm enthält; der Gehalt an nicht aus Zichorie stammender Trockenmasse darf 10 Gramm in einem Kilogramm nicht überschreiten;
- b) Zichorien-Extrakt in Pastenform, Zichorien-Extrakt-Paste:
konzentriertes pastenförmiges Erzeugnis, das 700 bis 850 Gramm Zichorien-Extrakttrockenmasse in einem Kilogramm enthält; der Gehalt an nicht aus Zichorie stammender Trockenmasse darf 10 Gramm in einem Kilogramm nicht überschreiten;
- c) flüssiger Zichorien-Extrakt, Zichorien-Extrakt in flüssiger Form:
konzentriertes flüssiges Erzeugnis, das 250 bis 550 Gramm Zichorien-Extrakttrockenmasse in einem Kilogramm enthält; es darf außerdem bis zu 350 Gramm ungebrannte oder gebrannte Zuckerarten in einem Kilogramm enthalten.

Diese Erzeugnisse werden durch Extraktion von gerösteter Zichorie (*Cichorium intybus* L.), die zum Trocknen und Rösten einwandfrei gereinigt ist und nicht für die Herstellung der Zichorie Witloof verwendet wird, unter ausschließlicher Verwendung von Wasser als Extraktionsmittel gewonnen und durch den Entzug von Wasser konzentriert.

15. Backverbesserungsmittel

15.1. Allgemeines

15.1.1. Backmittel

Die heute allgemein übliche Verwendung von Backmitteln bei der Herstellung von Backwaren ist Teil der technologischen Bemühungen, aus Weizen- und Roggenmehlerzeugnissen Backwaren von hohem Genuss-, Gebrauchs- und Nährwert zu erhalten. Neben dem Einsatz von Maschinen zur Teig- bzw. Massenbereitung, zu deren Aufbereitung und zum Backen ist die Verwendung von Backmitteln eine gezielte Maßnahme zur Verbesserung von Herstellungsverfahren und Qualität der Backwaren.

Gemäß der Leitsätze für Brot- und Kleingebäck sind Backmittel Mischungen von Lebensmitteln einschließlich Zusatzstoffe, die dazu bestimmt sind, die Herstellung von Backwaren zu erleichtern oder zu vereinfachen, die wechselnden Verarbeitungseigenschaften der Rohstoffe auszugleichen und die Qualität der Backwaren zu beeinflussen.

Backmittel sind funktional wirkende Zusatzstoffe, deren Inhaltsstoffe sich gegenseitig in ihrer Wirkung beeinflussen und so zusammengesetzt sind, dass sie den jeweiligen Anforderungen bezüglich Mehlarart und der angestrebten Gebäckqualität entsprechen.

15.1.2. Inhaltsstoffe von Backmitteln

Die Wirkung einiger Zusatzstoffe, wie α -Amylase, Ascorbinsäure, Papain, Cystein, Zuckerkulör und Diacetylweinsäureester, ist in den einzelnen Phasen der Teig- und Backwarenherstellung unterschiedlich. Stoffe, die für die Optimierung der Teigeigenschaften eingesetzt werden, müssen nicht gleichermaßen für die Optimierung des Gärprozesses geeignet sein. Daher werden Backmittel aus mehreren backaktiven Anteilen zusammengesetzt, die ihre Wirkung nacheinander in allen Phasen des Herstellungsprozesses entfalten.

15.2. Gesetzliche Regelungen

Zusatzstoff		Höchstmenge
α -Amylase	Bedarf keiner besonderen Zulassung gemäß LFGB § 6 (2) Abs 1	-
Ascorbinsäure	ZZuIV Anl 4 A, 4 C (LFGB § 5 Abs. 1 und § 7)	qs
Cystein	ZZuIV Anl 4 A, 4 C (LFGB § 5 Abs. 1 und § 7)	
Diacetylweinsäureester	ZZuIV Anl 4 A, 4 C (LFGB § 5 Abs. 1 und § 7)	
Lecithin	ZZuIV Anl 4 A, 4 C, 6 B-D; AromenV Anl.5, TeigwarenV § 2 (LFGB § 5 Abs. 1 und § 7)	
Sojamehl	Bedarf keiner besonderen Zulassung gemäß LFGB § 6 (2) Abs 1	-
Zuckerkulör	ZZuIV Anl 1 A, 1 C (LFGB § 3 Abs. 1 und § 7)	qs

15.3. Prinzip der Methode

15.3.1. Mikrobackversuche

Backversuche mit kleinen Mehlmengen (8-30 g) sind wertvoll für Untersuchungen über den Einfluss von Mehlinhaltsstoffen und Backhilfsmitteln auf das Gebäckvolumen und die Eigenschaften von Krume und Kruste. Außerdem sind sie geeignet für die Beurteilung von neugezüchteten Getreidesorten bzw. der daraus hergestellten Mehle, von denen zunächst nur kleine Mengen zur Verfügung stehen.

15.4. Durchführung

Backzutaten / Chemikalien

- | | |
|------------------|----------------|
| - Weizenmehl | - dest. Wasser |
| - Natriumchlorid | - Zusatzstoffe |
| - Trockenhefe | |

Geräte

- | | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| - Rührschüssel | - Porzellanschale |
| - Waage | - Backblech |
| - Glasstab | - Kunststoffflasche |
| - Rührwerk | - Glasperlen, Senfkörner o. ä. |
| - Glasplatte | - Schüssel |
| - Alufolie | - Lineal |
| - Trockenschrank bzw. Backofen | - Messzylinder |

15.4.1. Teigbereitung

50,0 g Weizenmehl (Type 405), 0,60 g Natriumchlorid und 0,50 g Trockenhefe werden in einer Rührschüssel eingewogen und mit einem Glasstab kurz durchmischt. Mithilfe einer Pipette werden 30,0 mL kaltes Wasser hinzu gegeben und anschließend mit dem Glasstab nochmals vermengt, bis kein trockenes Mehl mehr vorhanden ist. Der am Glasstab haftende Teig wird vollständig zur Masse gegeben und mit der Hand gründlich verknetet.

15.4.2. Teiggärung

Der fertige Teig wird zu einem runden Laib geformt, auf eine Glasplatte gesetzt, mit Alufolie abgedeckt und wie folgt weiterbehandelt:

- | | |
|-------------|--|
| 1. Teigruhe | 30 min bei 32 °C (Trockenschrank vorgeheizt)
1 min mit den Händen gut durchkneten |
| 2. Teigruhe | 30 min bei 32 °C (Trockenschrank vorgeheizt)
1 min mit den Händen gut durchkneten |

Danach werden 3x 20,0 g des Teiges abgewogen, in kleine Laibe geformt und auf Alufolie gesetzt. Mit Alufolie bedecken und zur Gare 45 min bei 32 °C in den Trockenschrank legen.

15.4.3. Backen (thermische Umwandlung des Teiges in eine feste Backware)

Den Trockenschrank auf 250 °C vorheizen (keine Belüftung!) und 15 min vor Backbeginn eine Porzellanschale mit 300 mL Wasser zur Schwadenbildung auf den Boden des Trockenschrankes stellen. Die Abdeckfolie der Brötchen abnehmen und zusammen mit der unteren Alufolie auf ein Blech legen und genau 20 min backen. Während der Backzeit den Trockenschrank nicht öffnen! Am Ende der Backzeit die Brötchen herausnehmen und abkühlen lassen. Falls die Ofentemperatur nicht erreicht werden kann, muss die Backzeit um 2-5 min verlängert werden.

Dabei ist wichtig, dass alle Brötchen, die miteinander verglichen werden sollen, auf einer Backhöhe gebacken werden.

15.5. Zusätze

- | | |
|----------------------------|---|
| 1. α -Amylase: | 20 mg α -Amylase (37,2 u/mg) in 100,0 mL Wasser lösen.
30,0 mL der gekühlten Lösung zur Teigbereitung verwenden |
| 2. Ascorbinsäure: | 10 mg Ascorbinsäure mit Salz und Hefe einwiegen
(100-200 mg/kg) |
| 3. Cystein: | 3 mg Cystein mit Salz und Hefe einwiegen
(50 mg/kg) |
| 4. Diacetylweinsäureester: | 100 mg Diacetylweinsäureester mit Salz und Hefe einwiegen
(0,2 %) |
| 5. Lecithin: | 150 mg (0,1–0,3 %) |
| 6. Sojamehl: | 500 mg (1 %) |
| 7. Zuckerkulör: | 4200 mg Zuckerkulör in 250,0 mL Wasser lösen und 30,0 mL
gekühlt zur Teigbereitung geben (1 %) |

15.6. Auswertung:

a) Bestimmung des Gewichtes

b) Bestimmung des Gebäckvolumens

Ein Kunststoffgefäß (z. B. eine abgeschnittene Chemikalienflasche), dessen Durchmesser größer als der der Brötchen sein muss, bis zum Rand mit Glasperlen, Senfkörnern o. ä. füllen; in eine Schüssel stellen und die Oberfläche mit einem Lineal glattstreichen und die überschüssigen Perlen entfernen. Anschließend wird die Hälfte der Perlen aus dem Gefäß in ein Becherglas gegeben, ein Brötchen auf die im Gefäß verbliebenen Perlen legen und wie zuvor bis zum Rand mit den Perlen aus dem Becherglas auffüllen.

Die „verdrängten“ Perlen in einen Messzylinder geben und das Volumen ablesen. Diese Bestimmung 3x wiederholen und den Mittelwert bilden. Diesen Vorgang der Volumenmessung mit jedem Brötchen wiederholen.

c) Beurteilung der Kruste (Farbe, Glanz, Struktur)

d) Beurteilung der Porung

Die Brötchen mit einem scharfen Sägemesser halbieren und die Schnittflächen beschreiben, z. B. gleichmäßige, ziemlich gleichmäßige oder ungleichmäßige Porung, große oder kleine Poren, Rissbildung, trocken oder klebrig, usw.

Von den Schnittflächen aller Brötchen wird ein gemeinsames digitales Foto angefertigt, ausgedruckt, entsprechend beschriftet und dem Protokoll angehängt.

15.7. Aufgabe

Untersuchen Sie Ihre Proben hinsichtlich der o. g. Beurteilungskriterien und vergleichen sie diese. Beurteilen Sie den Einfluss der eingesetzten Zusatzstoffe auf den Backprozess und die Qualität der Backware. Fertigen Sie ein Protokoll über diesen Versuch an!

15.8. Vorbereitung auf den Versuch

Folgende Themenkomplexe sollten vor Versuchsbeginn erarbeitet werden:

- ✓ Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuV)
- ✓ Auswirkungen der o. g. Zusatzstoffe als Backmittel

Literatur

- Baltes, W. „Lebensmittelchemie“ 6. Auflage
- Franzke, C. „Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie“ 3. Auflage
- Glandorf, Kuhnert, Lück, „Handbuch Lebensmittelzusatzstoffe“ Band 1-4

Erläuterungen zur Liste

Spalte 3: Funktionen, Anwendungsgründe oder Zusatzstoffklassen

A	Antioxidationsmittel	SM	Schaummittel
B	Backtriebmittel	Sv	Schaumverhüter
C	Komplexbildner	SS	Schmelzsalz
E	Emulgator	St	Stabilisator
F	Farbstoff	Sü	Süßungsmittel
Fe	Festigungsmittel	TG	Treibgas, Schutzgas
FS	Farbstabilisator	Tr	Trägerstoff, Füllstoff
G	Gelierungsmittel	V	Verdickungsmittel
GV	Geschmacksverstärker	W	Feuchthaltemittel
K	Konservierungsmittel	Ü	Überzugsmittel
M	Mehlbehandlungsmittel	Vit	vitaminwirksam
S	Säure, Säuerungsmittel	Min	Mineralstoffe
SR	Säureregulator		

Spalte 4: Vorkommen

N+	kommt in jeder lebenden Zelle vor
N	kommt in der Natur so vor
n	leicht verändert in der Natur
–	kommt so nicht in der Natur vor

Spalte 5: Herstellung

N+	aus natürlichen Quellen
N	aus natürlichen Quellen angereichert
n	natürlich, doch leicht verändert
ns	naturidentisch hergestellt
f	fermentativ hergestellt
S	synthetisch

Spalte 6: Der ADI-Wert

oder die akzeptierbare Tagesdosis ist das Maß für die sichere Verträglichkeit eines Stoffes, selbst bei jahrelanger täglicher Aufnahme. Es bedeuten:

- „Zahl“ ADI-Wert in mg/kg.d (= mg Substanz pro Kilo Körpergewicht täglich)
- NS Not specified = nicht zahlenmäßig begrenzt für Anwendungen, die einer „guten Herstellerpraxis“ entsprechen
- Acc akzeptabel, entspricht dem neueren NS
- a akzeptabel für bestimmte Anwendungen
- vorl. ADI-Wert nur vorläufig vergeben, erneute Prüfung ist vorgesehen

Spalte 7: Zulassungen

- A für Lebensmittel allgemein (mit Ausnahmen)
- B für bestimmte Lebensmittel
- C nur für wenige Lebensmittel

Spalte 8: Höchstmengen

- q ‚quantum satis‘, die für den gewünschten Zweck gerade erforderliche Menge, bei Beachten einer „guten Herstellerpraxis“
- b zahlenmäßig begrenzt
- e sehr eng begrenzt

A II-2 Verzeichnis der Zusatzstoffe und ihrer Eigenschaften**18****Liste der zugelassenen Zusatzstoffe (Stand Juli 2002)**

E-Nr.	Verkehrsbezeichnung	Funktionen	Vor- kom- men	Her- stel- lung	ADI	Zulassungen für LM	Men- ge
1	2	3	4	5	6	7	8
E 100	Kurkumin, Curcumin	F	N	N	Acc	B	b
E 101	Riboflavin, Riboflavin-5'-Phosphat	F, Vit	n	ns	Acc	A	q
E 102	Tartrazin	F	–	S	7,5	B	b
E 104	Chinolingelb	F	–	S	10	B	b
E 110	Gelborange S, Sunset-Yellow	F	–	S	2,5	B	b
E 120	Echtes Karmin, Cochenille	F	N	N	5	B	b
E 122	Azorubin	F	–	S	4	B	b
E 123	Amaranth	F	–	S	0,8	C	e
E 124	Cochenillerot A, Ponceau 4R	F	–	S	4	B	b
E 127	Erythrosin	F	–	S	0,1	C	e
E 128	Rot 2G	F	–	S	0,1	C	e
E 129	Allurarot AC	F	–	S	7	B	b
E 131	Patentblau V	F	–	S	15	B	b
E 132	Indigotin I	F	n	S	5	B	b
E 133	Brillantblau FCF	F	–	S	10	B	b
E 140	Chlorophylle, Chlorophylline	F	N	N	15	A	q
E 141	Kupfer-Chlorophylle	F	n	n	15	A	q
E 142	Grün S	F	–	S	5	B	b
E 150a	Einfaches Zuckerkulör	F	n	n	Acc	A	q
E 150b	Sulfitlaugen-Zuckerkulör	F	–	S	Acc	A	q
E 150c	Ammoniak-Zuckerkulör	F	–	S	200	A	q
E 150d	Ammonsulfit-Zuckerkulör	F	–	S	200	A	q
E 151	Brillantschwarz BN	F	–	S	5	B	b
E 153	Pflanzenkohle	F	n	N	Acc	A	q
E 154	Braun FK	F	–	S	0,15	C	e
E 155	Braun HT	F	–	S	3	B	b
E 160a	Carotine, Beta-Carotin	F, Vit	N+	N, ns	5	A	q
E 160b	Annatto, Bixin, Norbixin	D	N	n	2,5	B	e
E 160c	Paprikaextrakt, Capsorubin	F	N	N	Acc	A	q
E 160d	Lycopin	F	N	N	ns	NS	b
E 160e	Beta-apo-8'-Carotinal (C 30)	F	N	ns	5	B	b
E 160f	Beta-apo-8'Carotinsäure-Ethylester	F, Vit	n	ns	5	B	b
E 161b	Lutein	F	N	N	NS	B	b
E 161g	Canthaxanthin	F	N	ns	0,05	C	e
E 162	Beetenrot	F	N	N	NS	A	q
E 163	Anthocyane	F	N	N	Acc	A	q
E 170	Calciumcarbonat	F, Min, Tr, SR	N	N	NS	A	q
E 171	Titandioxid	F	N	ns	Acc	A	q

A II-2

Verzeichnis der Zusatzstoffe und ihrer Eigenschaften

20

E-Nr.	Verkehrsbezeichnung	Funktionen	Vor- kom- men	Her- stel- lung	ADI	Zulassungen für LM	Men- ge
1	2	3	4	5	6	7	8
E 260	Essigsäure	S, K	N+	f, ns	NS	A	q
E 261	Kaliumacetat	SR, K	n	ns	NS	A	q
E 262	Natriumacetat	SR, K	n	ns	NS	A	q
E 263	Calciumacetat	SR, K, Fe	n	ns	NS	A	q
E 270	Milchsäure	S, K, FS	N+	f, ns	NS	A	q
E 280	Propionsäure	K	N	ns	NS	C	b
E 281	Natriumpropionat	K	N	ns	NS	C	b
E 282	Calciumpropionat	K	N	ns	NS	C	b
E 283	Kaliumpropionat	K	N	ns	NS	C	b
E 284	Borsäure	K	n	ns	a	C	e
E 285	Natriumtetraborat, Borax	K	n	ns	a	C	e
E 290	Kohlendioxid, Kohlensäure	S, K, TG, B	N+	N	NS	A	q
E 296	Apfelsäure	S, FS	N+	ns	L	A	q
E 297	Fumarsäure	S	N+	ns	6	B	q
E 300	Ascorbinsäure	A, FS, S, M, Vit	N+	ns	Acc	A	q
E 301	Natriumascorbat	A, FS, S, M, Vit	N+	ns	Acc	A	q
E 302	Calciumascorbat	A, FS, S, M, Vit	N+	ns	Acc	A	q
E 304	Fettsäureester der Ascorbinsäure	A, E, FS, Vit	–	S	Acc	A	q
E 306	Stark tocopherolhaltige Extrakte	A, FS, Vit	N	N	Acc	A	q
E 307	Alpha-Tocopherol	A, FS, Vit	N	ns	Acc	A	q
E 308	Gamma-Tocopherol	A, FS, Vit	N	ns	Acc	A	q
E 309	Delta-Tocopherol	A, FS, Vit	N	ns	Acc	A	q
E 310	Propylgallat	A	–	S	0,5	B	b
E 311	Octylgallat	A	–	S	0,5	B	b
E 312	Dodecylgallat	A	–	S	0,5	B	b
E 315	Isoascorbinsäure	A, FS, C	–	S	6	C	e
E 316	Natriumisoascorbat	A, FS, C	–	S	6	C	e
E 320	Butylhydroxyanisol, BHA	A	–	S	0,5 vorl	B	e
E 321	Butylhydroxytoluol, BHT	A	–	S	0,05 vorl	C	e
E 322	Lecithine	E, A, St	N+	N	NS	A	q
E 325	Natriumlactat	SR, SS, Fe,	WN	ns	NS	A	q
E 326	Kaliumlactat	SR, SS, Fe	N	ns	NS	A	q
E 327	Calciumlactat	SR, SS, Fe, Min	N	ns	NS	A	q
E 330	Citronensäure	S, C, FS	N+	f	NS	A	q
E 331	Natriumcitrate	SR, SS, FS, C	N	ns	NS	A	q
E 332	Kaliumcitrate	SR, SS, FS, C	N	ns	NS	A	q

E-Nr.	Verkehrsbezeichnung	Funktionen	Vor- kom- men	Her- stel- lung	ADI	Zulassungen	
						für LM	Men- ge
1	2	3	4	5	6	7	8
E 471	Mono- Diglyceride von Speisefettsäuren, MDG	E, SM	N+	N	NS	A	q
E 472a	Essigsäureester von MDG	E, SM	–	n	NS	A	q
E 472b	Milchsäureester von MDG	E, SM	–	n	NS	A	q
E 472c	Citronensäureester von MDG	E, SM	–	n	NS	A	q
E 472d	Weinsäureester von MDG	E, SM	–	n	NS	A	q
E 472e	Mono- und Diacetylweinsäure- ester von MDG	E, SM	–	S	NS	A	q
E 472f	Gemischte Wein- und Essigsäure- ester von MDG	E, M, SM	–	S	NS	A	q
E 473	Zuckerester von Speisefettsäuren	E	–	n	–	B	b
E 474	Zuckerglyceride	E	–	n	–	B	b
E 475	Polyglycerinester von Speisefett- säuren	E	n	n	25	B	b
E 476	Polyglycerin-Polyricinoleat, PGPR	E, St	–	S	7,5	C	b
E 477	Propylenglycolester von Speisefett- säuren	E	–	S	25	B	b
E 479b	Thermooxydiertes Sojaöl mit MDG	E, Tr	n	S	Acc	C	q
E 481	Natriumstearoyl-2-lactylat, NSL	E	–	n	20	B	b
E 482	Calciumstearoyl-2-lactylat, CSL	E	–	n	20	B	b
E 483	Stearyltartrat	E	–	n	20	C	b
E 491	Sorbitanmonostearat	E	–	S	25	B	b
E 492	Sorbitantristearat	E	–	S	25	B	b
E 493	Sorbitanmonolaurat	E	–	S	25	B	b
E 494	Sorbitanmonooleat	E	–	S	25	B	b
E 495	Sorbitanmonopalmitat	E	–	S	25	B	b
E 500	Natriumcarbonate, Soda	SR, B, Tr	N	ns	NS	A	q
E 501	Kaliumcarbonate, Pottasche	SR, B, Tr	N	ns	NS	A	q
E 503	Ammoniumcarbonate	SR, B, Tr	–	S	NS	A	q
E 504	Magnesiumcarbonat	SR, B, Tr	N	n	NS	A	q
E 507	Salzsäure	S	N	S	NS	A	q
E 508	Kaliumchlorid	GV, Fe	N	N	NS	A	q
E 509	Calciumchlorid	Fe, GV, Min	N	ns	NS	A	q
E 511	Magnesiumchlorid	Fe, Min	N	ns	NS	A	q
E 512	Zinn-II-chlorid	A, FS	–	S	2	C	e
E 513	Schwefelsäure		S	–	S	A	q
E 514	Natriumsulfate	SR, Tr, Fe	N	ns	NS	A	q
E 515	Kaliumsulfate	SR, Tr, Fe	N	ns	NS	A	q
E 516	Calciumsulfat, Gips	SR, Tr, Fe	N	ns	NS	A	q
E 517	Ammoniumsulfat	SR, Tr, Fe	–	S	NS	A	q
E 520	Aluminiumsulfat	Fe	n	S	1 Al	C	e
E 521	Aluminium-Natriumsulfat	Fe	n	S	1 Al	C	e
E 522	Aluminium-Kaliumsulfat, Alaun	Fe	n	S	1 Al	C	e

E-Nr.	Verkehrsbezeichnung	Funktionen	Vor- kom- men	Her- stel- lung	ADI	Zulassungen für LM	Men- ge
1	2	3	4	5	6	7	8
E 632	Dikaliuminosinat	GV	n	n	NS	A	b
E 633	Calciuminosinat	GV	n	n	NS	A	b
E 634	Calcium-5'-ribonucleotide	GV	n	n	NS	A	b
E 635	Dinatrium-5'-ribonucleotide	GC	n	n	NS	A	b
E 640	Glycin und dessen Natriumsalz	GV	N	f	NS	C	e
E 650	Zinkacetat	GV, FS	–	S	a	C	b
E 900	Dimethylpolysiloxan, DMPS	Sv	–	S	1,5	B	b
E 901	Bienenwachs, weiß und gelb	Tr, Ü	N	N+	Acc	B	q
E 902	Candelillawachs	Tr, Ü	N	N+	vorl Acc	B	q
E 903	Carnaubawachs	Tr, Ü	N	N	vorl Acc	B	q
E 904	Schellack	Tr, Ü	N	N	vorl Acc	B	q
E 905	Mikrokristallines Wachs	Tr, Ü	N	N	NS	B	q
E 912	Montansäureester	Ü	n	n	vorl Acc	B	q
E 914	Polyethylenwachsoxidate	Ü	–	S	vorl Acc	B	q
E 920	L-Cystein	M	N+	N	NS	C	q
E 927b	Carbamid, Harnstoff	St	N	N	a	C	e
E 938	Argon	TG	N	N	ACC	A	q
E 939	Helium	TG	N	N	Acc	A	q
E 941	Stickstoff	TG	N	N	Acc	A	q
E 942	Distickstoffmonoxid, Lachgas	TG	N	ns	Acc	A	q
E 943a	Butan	TG	–	S	a	C	q
E 943a	Isobutan	TG	–	S	a	C	q
E 944	Propan	TG	–	S	a	C	q
E 948	Sauerstoff	TG	N	N	a	A	q
E 949	Wasserstoff	TG	N	N	a	A	q
E 950	Acesulfam-K	Sü, GV	–	S	9	B	b
E 951	Aspartam	Sü, GV	–	S	40	B	b
E 952	Cyclohexansulfamidsäure, Cyclamate	Sü	–	S	7	B	b
E 953	Isomalt	Sü, Tr	–	S	Acc#	B	q
E 954	Saccharin, Saccharin-Na, -Ca und -K	Sü	–	S	2,5 vorl	B	b
(E 955	Sucralose, Trichlorogalacto- sucrose	Sü	–	S	15	B	b)
E 957	Thaumatococcus	Sü, GV	N	N	Acc	B	b
E 959	Neohesperidin DC	Sü	n	n	5	B	b
E 962	Aspartam-Acesulfam-Salz	Sü	–	S	x	B	b
E 965	Maltit, Maltitsirup	Sü, Tr	–	S	Acc#	B	q
E 966	Lactit	Sü, Tr	–	S	Acc#	B	q